

Gabriela Christina Kuhl

**SELEÇÃO DE BACTÉRIAS ÁCIDO LÁCTICAS PARA A
OTIMIZAÇÃO TECNOLÓGICA NA BIOPRODUÇÃO DE
ÁCIDO LINOLÉICO CONJUGADO EM IOGURTE DE
LEITE DE OVELHA**

Dissertação submetida ao
Programa de Pós Graduação
em Ciência dos Alimentos
da Universidade Federal de
Santa Catarina para
obtenção do Grau de mestre
em Ciência dos Alimentos.

Orientador: Prof. Dr. Juliano
De Dea Lindner

Florianópolis
2016

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Kuhl, Gabriela Christina
SELEÇÃO DE BACTÉRIAS ÁCIDO LÁCTICAS PARA A OTIMIZAÇÃO
TECNOLÓGICA NA BIOPRODUÇÃO DE ÁCIDO LINOLÉICO CONJUGADO EM
IOGURTE DE LEITE DE OVELHA / Gabriela Christina Kuhl ;
orientador, Juliano De Dea Lindner - Florianópolis, SC,
2016.
115 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa
Catarina, Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós
Graduação em Ciência dos Alimentos.

Inclui referências

1. Ciência dos Alimentos. 2. Bactérias Ácido Lácticas.
3. Ácido Linoléico Conjugado. 4. Iogurte. 5. Leite de
Ovelha. I. De Dea Lindner, Juliano. II. Universidade
Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em
Ciência dos Alimentos. III. Título.

BANCA EXAMINADORA

AGRADECIMENTOS

A Deus por me iluminar e guiar nesta caminhada .

Ao meu noivo César Longino Aparicio pelo incentivo e amor incondicional. Aos meus pais, Rubens Adalberto Kuhl e Dalva de Oliveira Kuhl, pelo suporte e conforto. Às minhas irmãs Carolina Fernanda Kuhl e Jéssica Daniela Kuhl pela força e companheirismo. À minha avó Telma de Oliveira pelas orações. À Oda Terezinha Zeni pelo acolhimento e carinho.

Ao meu orientador Professor Juliano De Dea Lindner, por se fazer presente nesta jornada de aprendizado, pela paciência, companheirismo e por acreditar em mim.

Aos Professores Neila Silvia Pereira dos Santos Richards e Marcone Augusto Leal de Oliveira, pelo envolvimento e interesse à pesquisa e pela parceria fundamental para a realização deste trabalho.

Às colegas Ana Paula Gusso e Brenda Lee Simas Porto pelo amparo e, pela dedicação ao trabalho.

Aos professores do Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos pelos ensinamentos, sobretudo àqueles que participaram diretamente em minha formação, Professora Carmen Maria Oliveira Müller e Professor Ernani Sebastião Sant’anna.

Ao senhor Paulo Gregianin pelo fornecimento de leite de ovelha.

À Professora Juliana Steffens pelo fornecimento de leite de ovelha em pó.

À CAPES pela bolsa de estudos.

“É muito melhor lançar-se em busca de conquistas grandiosas, mesmo expondo-se ao fracasso, do que alinhar-se com os pobres de espírito, que nem gozam muito nem sofrem muito, porque vivem numa penumbra cinzenta, onde não conhecem nem vitória, nem derrota”

(Theodore Roosevelt)

RESUMO

Estudos recentes indicam que os isômeros de ácido linoléico conjugado (CLA), possuem importantes atividades biológicas que os destacam em benefícios para a saúde humana. O CLA corresponde a um grupo heterogêneo de isômeros geométricos e posicionais do ácido linoléico (AL) encontrados, principalmente, na fração gordurosa de produtos lácteos de animais ruminantes. Os isômeros de CLA são produzidos a partir do AL como produto intermediário no processo da biohidrogenação, pelas bactérias do rúmen. Pesquisas recentes apontaram diversas espécies bacterianas capazes de converter eficientemente o AL em CLA. Neste trabalho, 35 bactérias ácido lácticas (BAL) foram testadas por sua habilidade em produzir CLA a partir de AL em leite de ovelha. Dentre as cepas testadas, *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* 2230 e *Streptococcus thermophilus* St. 360 apresentaram melhor capacidade de produzir CLA (isômero C18:2 *cis*-9, *trans*-11). Pela primeira vez, o efeito das variáveis do processo foram investigados sobre a produção de CLA em iogurte de leite de ovelha utilizando estas duas cepas em co-cultura. Foi aplicado um planejamento experimental fatorial para examinar o efeito de quatro variáveis independentes (glicose; leite de ovelha em pó; AL e proporção das cepas). A condição ótima para alcançar a maior concentração de CLA (70,41 mg/g) em iogurte de leite de ovelha, deu-se através da adição de 10 g/L (p/v) de glicose; 30 g/L (p/v) de leite de ovelha em pó; 0,90 g/L (p/v) de AL e proporção de 1:2 (v/v) entre as cepas (St:Lb). Os iogurtes apresentaram decréscimo no teor de CLA após 14 dias sob refrigeração a 5 °C. A fim de conferir benefícios à saúde, o iogurte produzido neste trabalho (rico em CLA), pode ser uma importante fonte para aumentar o consumo diário de CLA na dieta humana.

Palavras-chave: *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*, *Streptococcus thermophilus*, ácido linoléico conjugado.

ABSTRACT

Recent studies have shown that isomers of conjugated linoleic acid (CLA) content present in dairy products improves human health by its functional properties. The CLA is a hetero-geneous group of positional and geometric isomers of linoleic acid (LA), commonly present in dairy fat from ruminants animals. The CLA isomers are produced from LA as an intermediate in biohydrogenation pathway, process carried out by rumen bacteria. Different bacterial species demonstrated the ability to produce CLA from LA. In this work, 35 lactic acid bacteria (LAB) were screened for CLA (C18:2 *cis*-9, *trans*-11 isomer) producing ability from LA as substrate in fermented sheep milk. Among the screened strains, *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* 2230 and *Streptococcus thermophilus* St. 360 showed the highest CLA producing ability. For the first time, the effect of process variables were investigated on production of CLA in sheep's milk yogurt using these two strains in co-culture. An eleven run experimental design was applied to assay the effect of four independent variables (glucose; powder sheep milk; LA and inoculums ratio). The optimum conditions to find the highest CLA production in sheep's milk yogurt (70.41 mg/g) was obtained adding 10 g/L (w/v) glucose; 30 g/L (w/v) powder sheep milk; 0,90 g/L (w/v) LA and 1:2 (St:Lb) (v/v) proportion strain. After storage at 5 °C during 14 days, CLA concentration in the yogurts showed a decrease. In order to confer human health benefits, the CLA rich yogurt produced in this work could be an important source to increase the assumption level of CLA in the human daily ingestion.

Keywords: *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*, *Streptococcus thermophilus*, Conjugated linoleic acid.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Ligações duplas isoladas e conjugadas	41
Figura 2. Isômeros geométricos de AG (configurações <i>cis</i> e <i>trans</i>)	42
Figura 3. Principais rotas metabólicas da biohidrogenação do ácido linoléico	43
Figura 4. Representação esquemática de um equipamento de CG	56
Figura 5. Superfície de resposta do efeito significativo ($p < 0.05$) da interação na síntese de CLA	74
Figura 6. Cromatograma dos EMAG obtido a partir de iogurte de leite de ovelha. Ampliação demonstra o pico cromatográfico do isômero C18:2 <i>cis</i> -9, <i>trans</i> -11	75
Figura 7. Revisão da literatura sobre Biohidrogenação do AL por BAL	115

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Atividades biológicas dos isômeros de CLA.....	48
Quadro 2. Suplementos alimentares comerciais de CLA (não exaustiva).....	54
Quadro 3. Cepas inicialmente testadas para identificação da habilidade em produzir CLA a partir de AL em leite de ovelha fermentado.....	59
Quadro 4. Fluxograma de produção das formulações de iogurte	65

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Produção de leite de ovelha	35
Tabela 2. Composição de micronutrientes dos leites de cabra, ovelha e vaca	37
Tabela 3. Comparação de valores dos componentes básicos dos leites ovino, caprino e bovino.....	38
Tabela 4. Porcentagem de CLA (C18:2 cis-9, <i>trans</i> -11) no leite de animais ruminantes	40
Tabela 5. Estratégias para aumentar a produção de CLA pelas bactérias lácticas.....	45
Tabela 6. Matriz experimental proposta pelo delineamento fatorial fracionado para testar a influência das variáveis independentes	64
Tabela 7. Níveis codificados e valores reais para o delineamento fatorial	64
Tabela 8. Aumento/decréscimo de CLA em leite de ovelha fermentado por cepas de <i>Lb. bulgaricus</i> e <i>St. thermophilus</i>	69
Tabela 9. Comparação entre os valores de CLA (%) reais e previstos pelo modelo polinomial quadrático.....	73
Tabela 10. Análise de variância (ANOVA) para o valor modelo polinomial fatorial ajustado para otimização na produção de CLA e equação do modelo	73
Tabela 11. Características físico-químicas dos tratamentos referentes às diferentes formulações dos iogurtes de leite ovelha produzidos	79
Tabela 12. Níveis de AG (% EMAG totais) e CLA (mg/g de lipídio) dos tratamentos no 1º e 14º dias após fermentação.....	81
Tabela 13. Perfil de AG dos iogurtes de leite ovelha produzidos (mg/g de lipídio).....	84

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AG – Ácido graxo
AGI – Ácido graxo insaturado
AGMI – Ácido graxo monoinsaturado
AGPI – Ácido graxo poliinsaturado
AGS – Ácido graxo saturado
AGT – Ácido graxo *trans*
AL – Ácido Linoléico (LA – do inglês, *Linoleic Acid*)
ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AOAC – do inglês, *Association of Official Analytical Chemists*
AV – Ácido Vacênico
BAL – Bactérias Ácido Lácticas (LAB – do inglês, *Lactic Acid Bacteria*)
CG – Cromatografia a Gás
CLA – Ácido Linoléico Conjugado (do inglês, *Conjugated Linoleic Acid*)
CLAE – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
DIC – Detecção por Ionização de Chama
EFSA – do inglês, *European Food Safety Authority*
EMAG – Ésteres Metílicos de Ácidos Graxos
EPAGRI – Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural
EPS – Exopolissacarídeo
FDA – do inglês, *Food and Drug Administration*
FOSHU – do inglês, *Foods for Specified Health Use*
GRAS – do inglês, *Generally Recognized As Safe*
IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IN – Instrução Normativa
ISO – do inglês, *International Organization for Standardization*
IVTF – Infravermelho com Transformada de Fourier
MRS – Man Rogosa Sharpe
NIDAL – Núcleo Integrado de Desenvolvimento de Análises Laboratoriais
PIQ – Padrões de Identidade e Qualidade
PNH – do inglês, *Products Natural Health*
RMN – Ressonância Magnética Nuclear
UFC – Unidades Formadoras de Colônia

SUMÁRIO

1.1 OBJETIVOS.....	25
1.1.1 Objetivo geral	25
1.1.2 Objetivos específicos.....	26
2.1 BACTÉRIAS ÁCIDO LÁCTICAS.....	27
2.1.1 Propriedades Tecnológicas	27
2.1.2 Culturas Clássicas de Iogurte	30
2.2 IOGURTE.....	32
2.3 LEITE OVINO	34
2.3.1 Aspectos Econômicos do Leite Ovino.....	34
2.3.2 Características Nutricionais do Leite Ovino.....	36
2.4 SÍNTESE DE CLA.....	40
2.4.1 Produção de CLA por BAL	44
2.5 CLA E BENEFÍCIOS À SAÚDE	47
2.6 CLA E POTENCIAL ALEGAÇÃO DE FUNCIONALIDADE.....	51
2.7 MÉTODOS ANALÍTICOS PARA QUANTIFICAÇÃO DE CLA	55
2.7.1 Cromatografia a gás.....	55
2.7.2 Preparo da amostra	57
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	59
3.1 CEPAS BACTERIANAS E CONDIÇÕES DE CRESCIMENTO.....	59
3.2 TESTE DA PRODUÇÃO DE CLA PELAS CEPAS.....	61
3.3 ANÁLISE DE ÁCIDOS GRAXOS	61
3.4 CRESCIMENTO EM MEIO COM AL.....	63
3.5 PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL E ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	63
3.5.1 Produção do iogurte.....	65
3.5.2 Identificação e quantificação do isômero de CLA.....	66
3.6 ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS	67
4.1 SELEÇÃO DAS BAL PRODUTORAS DE CLA	69
4.2 AVALIAÇÃO DA TOLERÂNCIA E HABILIDADE DAS BAL EM CRESCER NA PRESENÇA DE AL.....	71
4.3 OTIMIZAÇÃO TECNOLÓGICA NA PRODUÇÃO DE CLA EM IOGURTE DE LEITE DE OVELHA.....	72
4.4 ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS	78
4.5 COMPOSIÇÃO DE ÁCIDOS GRAXOS	80

5 CONCLUSÃO	87
REFERÊNCIAS.....	89
APÊNDICE A – TRABALHO PUBLICADO	115

1 INTRODUÇÃO

O agronegócio brasileiro constitui um setor de importância socioeconômica em contínua expansão. O desenvolvimento de novos produtos alimentícios e sua conseqüente transferência tecnológica gera crescente interesse associado ao potencial econômico envolvido, porém ainda constitui um desafio. A ciência de base e o desenvolvimento de processos e de produtos são estratégias para viabilizar este mecanismo, atuando como elos das cadeias produtivas da área contemplada neste experimento.

O setor produtivo de leite no Brasil se encontra em plena expansão com uma produção que ultrapassam a cifra de 28 bilhões de litros ao ano. Este setor é uma das maiores cadeias alimentares brasileiras, considerando o faturamento aproximado de R\$ 60 bilhões segundo o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) - Pesquisa Pecuária Municipal. Estima-se um aumento da produção em 6% ao ano para os próximos anos. A produção de leite brasileira representa aproximadamente 5% da produção mundial, o que torna o Brasil sexto colocado na escala mundial. Entre os estados brasileiros, Santa Catarina (SC) é o quinto maior produtor, com 1,85 milhões de litros, sendo a região oeste a principal bacia leiteira a qual responde por 64% desse volume (www.milkpoint.com.br).

Nos últimos anos, com a expansão da atividade de produção, industrialização e distribuição, o setor lácteo tornou-se a mais importante atividade para pelo menos 60.000 estabelecimentos rurais de SC. Projeções indicam que o estado terá, nos próximos anos, a maior bacia leiteira do país, segundo informações fornecidas pela Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural (EPAGRI). O estado de SC tem obtido considerável destaque no cenário nacional com crescente produção de derivados lácteos de valor agregado como, iogurtes, queijos e sorvetes. Apesar disso, a região Serrana de SC destaca-se por alguns investimentos com obtenção e processamento de leite de ovelha, porém ainda existe pouca oferta de produtos lácteos derivados do leite de ovelha no mercado.

A fermentação láctea é o processo responsável pelos produtos lácteos fermentados, tais como o iogurte. Cepas selecionadas de micro-organismos comumente conhecidas como bactérias ácido lácticas (BAL) são utilizadas para a produção de vários produtos lácteos fermentados. O consumo de iogurte tem

sido considerado benéfico para a saúde humana (KIM; LIU, 2002; MEHTA; KAMAL-ELDIN; IWANSKIR, 2012).

Os alimentos fermentados representam 40% do mercado mundial de alimentos industrializados (Innova Database). O acurado controle do processo fermentativo (tecnologia) faz-se necessário para a obtenção de um iogurte com características organolépticas superiores, o que associado com a qualidade da matéria prima, suporta a vitalidade econômica do setor de lácteos da indústria de alimentos.

Peptídeos bioativos podem ser gerados durante a fermentação do leite por BAL tradicionais como cultivo iniciador (*starter*) para a elaboração de produtos lácteos. Dessa forma, diversos tipos de peptídeos bioativos, com funcionalidades diferentes, podem ser encontrados em produtos finais, como, por exemplo, queijos, iogurtes, leites fermentados e etc. Este exemplo citado para estes produtos lácteos tradicionais podem trazer alguns benefícios à saúde, quando ingeridos como parte de uma dieta diária regular (KIM; LIU, 2002; MACEDO; MACEDO, 2011; MEHTA; KAMAL-ELDIN; IWANSKIR, 2012).

Deste modo, pesquisas que permitam um melhor entendimento dos processos, podem promover o desenvolvimento de produtos lácteos de valor agregado com potencial transferência tecnológica. Alguns pontos de interesse que direcionam estas questões podem ser citados: a procura por iogurtes com apelo funcional e as propriedades nutricionais de excelência conferidas pelo leite de ovelha (alta digestibilidade; alta concentração de vitaminas e minerais; tecnologia de produção aliada ao alto índice de concentração de sólidos totais, essencial à produção de iogurtes de qualidade (desenvolvimento de produtos diferenciados); derivados funcionais do leite de ovelha pós processo fermentativo com teores reduzidos de lactose (apelo para consumidores intolerantes) e teores elevados de ácido linoléico conjugado (CLA, do inglês *conjugated linoleic acid*).

O CLA corresponde a um grupo heterogêneo de isômeros geométricos e posicionais do ácido linoléico (AL), encontrados principalmente, na fração gordurosa de produtos lácteos e cárneos de ruminantes (BENJAMIN; SPENER, 2009). O CLA é um composto bioativo capaz, por exemplo, de modular a resposta inflamatória e atenuar a carcinogênese (KIM et al., 2009; XU; BOYLSTON; GLATZ, 2005).

Desta forma, sob o ponto de vista da prevenção à perda de saúde, justifica o desenvolvimento e a produção de alimentos funcionais como um iogurte de leite de ovelha com teores elevados de CLA, desenvolvido neste trabalho. A indústria de laticínios reage para aumentar a sua competitividade no segmento de produtos funcionais, para se adaptar às tendências de mudanças em um mercado consumidor exigente, que se modifica rapidamente, além de almejar a liderança tecnológica na indústria de alimentos.

O interesse pelo consumo de alimentos promotores de saúde tem aumentado substancialmente na última década. Além de alimentos saborosos e nutritivos, há um aumento na demanda, por alimentos que forneçam benefícios à saúde através da presença ou ausência de determinados compostos (DE RENOBLES et al., 2012). Neste contexto, os alimentos funcionais são tendência na indústria de alimentos, em consequência à comprovação científica da presença de compostos bioativos nestes alimentos, das relações existentes entre a promoção da saúde e, sobretudo ao interesse do consumidor por novas alternativas capazes de prevenir doenças crônicas não transmissíveis (SANTOS et al., 2012; XU; BOYLSTON; GLATZ, 2005).

Diante da procura dos consumidores por alimentos mais saudáveis, capazes de trazer benefícios extras à saúde, e dos potenciais efeitos benéficos do CLA e dos produtos lácteos fermentados, observou-se a necessidade de aplicação destes ao desenvolvimento de um novo produto com características funcionais e alto valor nutricional. Os resultados deste trabalho poderão gerar aplicações de relevância econômica, e de possível transferência tecnológica para a indústria de alimentos, visando incrementar a vitalidade e competitividade no mercado. Além do mais, este trabalho gerou dados pioneiros relativos à aplicação de micro-organismos conversores do AL em CLA em produtos lácteos ricos em CLA.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo geral

Selecionar cepas de *Streptococcus thermophilus* e *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* por sua capacidade em sintetizar CLA a partir de AL, além de investigar o efeito das

variáveis do processo sobre a síntese de CLA pelas cepas previamente selecionadas na produção de um iogurte de leite de ovelha.

1.1.2 Objetivos específicos

- Avaliar a capacidade produtora de CLA *in vitro* de 13 cepas de *Lb. bulgaricus* e 22 cepas de *St. thermophilus* individualmente, através da suplementação do meio de crescimento (leite de ovelha) com o substrato AL;
- Quantificar o teor de CLA dos leites fermentados pelas cepas individualmente por cromatografia gasosa;
- Avaliar o potencial inibitório e habilidade das bactérias selecionadas em crescer na presença de AL;
- Empregar a metodologia de superfície de resposta para investigar o efeito de quatro variáveis independentes sobre a síntese de CLA pelas cepas, previamente selecionadas, em fermentação protooperativa;
- Produzir iogurtes de leite de ovelha com base nas formulações do desenho experimental;
- Determinar a composição físico-química dos iogurtes.
- Aferir o teor de CLA e perfil de ácidos graxos nos iogurtes de leite de ovelha;
- Determinar a influência do período de 14 dias de armazenamento a 5 °C sobre a composição de ácidos graxos, especialmente a concentração de CLA dos iogurtes produzidos;

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 BACTÉRIAS ÁCIDO LÁCTICAS

As bactérias ácido lácticas (BAL) recebem esta denominação devido à sua capacidade de converterem carboidratos fermentáveis em ácidos orgânicos, principalmente ácido lático. São caracterizadas como micro-organismos Gram-positivos, não esporulantes, catalase-negativos, desprovidos de citocromo, anaeróbios facultativos e ácidos tolerantes. De acordo com a temperatura ótima de desenvolvimento, essas bactérias podem ser classificadas em mesofílicas (20-30 °C) ou termofílicas (35-45 °C) (GIRAFFA, 2012; REIS et al., 2011; ZHANG et al., 2013).

São consideradas pertencentes ao grupo das BAL, as bactérias dos gêneros *Aerococcus*, *Alloiococcus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Lactosphaera*, *Leuconostoc*, *Melissococcus*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* e *Weissella* (GIRAFFA, 2012; REIS, 2011).

As BAL são largamente utilizadas em diversas aplicações industriais, principalmente como cultivos iniciadores na produção de alimentos fermentados, como, por exemplo, leites fermentados, queijos, manteiga, salames e vegetais. Devido à sua capacidade de metabolizar proteínas, açúcares e lipídios, possuem grande influência sobre o perfil sensorial do produto final, resultando em modificação da textura, do sabor e do aroma (PESCUMA et al., 2008).

Estudos científicos indicam a importância dos produtos fermentados por culturas de BAL na alimentação de humanos, devido às diversas atividades biomodulatórias potenciais exercidas por componentes gerados após o processo fermentativo (CHOI et al., 2012; MRVCIC et al., 2012; RAMCHANDRAN; SHAH, 2008).

2.1.1 Propriedades Tecnológicas

Para conferir maior qualidade aos produtos lácteos fermentados, em especial os leites fermentados, é necessário o conhecimento sobre as propriedades tecnológicas dos micro-

organismos empregados. Com relação à fisiologia, as BAL são responsáveis pela fermentação e produção de ácidos para conduzir inicialmente o processo fermentativo (BROADBENT; STEELE, 2005; CHERIGUENE et al., 2007; DE DEA LINDNER, 2008).

O grupo dos *Lactobacillus* é dominante sobre os outros presentes em leite e seus derivados e dentre as BAL, e é reconhecido como o mais seguro do ponto de vista microbiológico e toxicológico. (SALVETTI; TORRIANI; FELIS, 2012).

Algumas espécies apresentam propriedades fisiológicas capazes de produzir ácido com intensidade durante a fermentação, sendo os principais responsáveis por esta etapa pela redução do pH e a consequente, coagulação do leite.

Existem vários metabólitos produzidos por BAL de interesse tecnológico, bem como, ácidos orgânicos (ácido láctico), peróxido de hidrogênio, dióxido de carbono, diacetil, acetaldeído e substâncias antimicrobianas de natureza protéica, como as bacteriocinas (GASPAR, et al., 2013; REIS et al., 2012; THARMARAJ; SHAH, 2009). As BAL também são importantes nos alimentos pela sua função probiótica (AHMADOVA et al., 2013; REIS et al., 2011; SUSKOVIC et al., 2010). Assim, quando administradas, em quantidade adequada, conferem benefícios à saúde do consumidor (FAO/WHO, 2002), como o equilíbrio da microbiota intestinal, aumento da resposta imune, redução da intolerância à lactose, inibição de micro-organismos patogênicos pela produção de compostos naturais, entre outros. Esses micro-organismos também produzem grande número de enzimas glicolíticas, lipolíticas e proteolíticas, as quais transformam os nutrientes fundamentais do leite e dos seus derivados em compostos com propriedades sensoriais desejáveis (VILJOEN, 2001).

Estudos demonstram ainda, a habilidade das culturas autóctones de BAL em produzir aromas distintos comparados com aqueles produzidos por culturas comerciais. Isto se dá devido à capacidade destas culturas em produzir enzimas conversoras de aminoácidos precursores de compostos aromáticos (CENTENO; CEPADA; RODRIGUEZ-OTERO, 2002).

A percepção sensorial dos produtos lácteos é um processo complexo, influenciado por muitos fatores, tais como a

composição de componentes flavorizantes, a textura e a aparência do produto (SMIT; SMIT; ENGELS, 2005), que podem ser originados de ações microbianas, enzimáticas e químicas, diretamente relacionadas às reações proteolíticas. Assim, a hidrólise das proteínas resultante da ação das proteinases e peptidases produzidas por BAL, contribui para a formação da textura e características sensoriais dos produtos fermentados. Contudo, os aminoácidos formados podem ainda ser degradados em aminas, ésteres, ácidos e tióis, contribuindo para a produção de diferentes aromas (GATTI et al., 2008; PRIETO et al., 2002).

Para a utilização de cultivos iniciadores na tecnologia de fabricação de produtos alimentícios, as culturas devem ser empregadas com base no seu desempenho tecnológico. Cultivos iniciadores com boas propriedades tecnológicas devem apresentar boa multiplicação no leite, promover propriedades sensoriais adequadas no produto e serem estáveis e viáveis durante o armazenamento. Desta forma, podem ser manipulados e incorporados em produtos alimentícios sem perder a viabilidade e a funcionalidade, resultando em produtos com textura e aroma adequados (DE OLIVEIRA et al., 2002).

A produção de exopolissacarídeos (EPS) por BAL é também um fator importante tecnologicamente para outras aplicações industriais. Em alguns produtos fermentados, a produção de EPS pode melhorar as características de textura do produto, assim como auxiliar na estabilidade durante a estocagem, reduzindo a sinérese. Folkenberg et al. (2006) analisaram produtos fabricados com cepas de *St. thermophilus* e *Lb. bulgaricus* produtoras e não produtoras de EPS, e afirmaram que a escolha das culturas bacterianas para a fermentação é um fator de controle das propriedades de textura. Sendo que, no fim da fermentação por uma cepa produtora de EPS pode-se obter, por exemplo, um iogurte com alta viscosidade, elevada cremosidade e baixa firmeza do gel. Esses atributos citados fazem parte de um painel sensorial utilizado para descrever propriedades de textura em iogurtes.

Existem várias substâncias produzidas por BAL, dentre elas os ácidos orgânicos (NAIDU; BIDLACK; CLEMENS, 1999). As BAL apresentam propriedades fisiológicas capazes de produzir com intensidade, sobretudo, ácido lático durante a fermentação de hexoses, sendo responsável pela redução do pH, daí o termo BAL que refere-se, principalmente, ao metabolismo

basal dessas bactérias (DE DEA LINDNER, 2008; SILVA, 2010). Importantes informações sobre a fisiologia de cepas industriais podem ser obtidas, pelo estudo das condições da cultura através da avaliação do seu perfil de atividade cinética (crescimento, acidificação, rendimento em biomassa ou ácidos lácticos). A quantificação da atividade acidificante das BAL permite comparar o desempenho de diferentes cepas ou diferentes combinações destas, durante a fermentação (SACCARO, 2008).

Além disso, as BAL produzem enzimas glicolíticas, lipolíticas e proteolíticas, capazes de provocar a hidrólise da caseína, por exemplo, e os aminoácidos formados podem ainda ser hidrolisados em compostos de menor massa molar como aminas, ésteres, ácidos e tióis, que contribuem para a produção de aromas (SILVA, 2010). Acetaldeído é o composto mais relevante para o aroma típico do iogurte. As concentrações de acetaldeído podem variar de um produto para o outro. Produtos com teores de acetaldeídos inferiores a 10 ppm são considerados como de baixa intensidade de *flavor*. A concentração de acetaldeído presente nos iogurtes contendo bactérias probióticas é inferior àquele fabricado com a cultura clássica do iogurte, ou seja, *St. thermophilus* e *Lb. bulgaricus* (DE OLIVEIRA et al., 2002).

2.1.2 Culturas Clássicas de Iogurte

Um cultivo iniciador lácteo é essencial na indústria de laticínios. Para a produção de derivados lácteos fermentados é fundamental que haja uma produção de ácido láctico, e o cultivo iniciador é adicionado com essa finalidade, pois inclui bactérias que convertem lactose em ácido láctico (JAY, 2005).

As etapas de produção de iogurte já são amplamente conhecidas pelas indústrias de produtos lácteos, bem como, a obrigatoriedade de utilização de cultivo iniciador atendendo a aspectos regulatórios, conforme Instrução Normativa (IN) nº 46, de 23 de Outubro de 2007, Regulamento técnico de identidade e qualidade de leites fermentados (BRASIL, 2007). O iogurte é produzido com cultivos iniciadores específicos, os quais são culturas mistas de *St. thermophilus* e *Lb. bulgaricus* em uma proporção de 1:1 (JAY, 2005).

2.1.2.1 *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*

O *Lb. bulgaricus* é um bacilo homofermentativo frequentemente utilizado em produtos lácteos fermentados, tem um papel importante na produção de ácido lático e na hidrólise protéica, dando origem a diversos compostos, como substâncias aromáticas, e peptídeos que podem desempenhar atividade biológica (FURTADO, 2011; LIU et al., 2012; ZHENG et al., 2014).

Algumas cepas de *Lb. bulgaricus* apresentam a capacidade de se adaptar a diferentes meios e tolerar temperaturas de refrigeração, calor e condições ácidas (LIU et al., 2012), além de, apresentarem potencial probiótico pela capacidade de auto-agregação, co-agregação, hidrofobicidade e presença de genes de adesão à mucosa intestinal (JERONYMO-CENEVIVA, 2013).

2.1.2.2 *Streptococcus thermophilus*

O *St. thermophilus* é um micro-organismo não-esporulado, homofermentante, anaeróbio facultativo, e resistente à temperatura de pasteurização. A faixa ideal de temperatura para seu crescimento é de 37 a 43 °C e praticamente não se desenvolve abaixo de 18 °C. Apresenta alta velocidade de produção de ácido lático na fabricação de iogurte, sob condições ideais de temperatura. Acidifica muito rapidamente, sobretudo se estiver associado com *Lb. bulgaricus*, com o qual cresce em boa simbiose. Entretanto, *St. thermophilus* é gradualmente inibido quando o teor de ácido lático atinge aproximadamente 1,2% (120 °D) (FURTADO, 2011).

Além de estar relacionado com a produção de ácido lático na fermentação do leite, o *St. thermophilus* possui outros importantes aspectos tecnológicos, tais como: metaboliza a galactose, apresenta sistema proteolítico e atividade ureática, além de, atributos funcionais tais como, a produção de EPS, bacteriocinas, biosurfactantes e vitaminas. Além disso, a partir do catabolismo de aminoácidos, produz um grande número de componentes aromáticos, como por exemplo, acetaldeído e derivados de leucina, fenilalanina e metionina (IYER et al., 2010).

2.2 IOGURTE

Segundo os Padrões de Identidade e Qualidade (PIQ) de Leites Fermentados (BRASIL, 2000) entende-se por iogurte os produtos resultantes da fermentação do leite, pasteurizado ou esterilizado, por fermentos lácticos próprios cuja fermentação se realiza com cultivos proto-simbióticos de *St. thermophilus* e *Lb. bulgaricus*. Os fermentos lácticos aludidos nesse item devem ser viáveis, ativos e abundantes no produto final durante seu prazo de validade, que no caso dos iogurtes deverão cumprir a contagem de micro-organismos específicos, bactérias lácticas totais (UFC/g) segundo a Norma FIL 117A:1988 de mínimo 7 log 10 UFC/g durante seu período de validade.

A expectativa de expansão de mercado do iogurte até 2020 gira em torno de US\$ 13 bilhões. Segundo relatório recente do TechNavio, o valor de mercado do iogurte é de US\$ 27,7 bilhões, e o crescimento de 7% está previsto para 2016, podendo aumentar a uma taxa de 8% ao ano até 2020. Esta categoria é crescente nos países em expansão como, Brasil, Rússia e Índia (DAIRY REPORTER, 2016).

O iogurte é um produto que apresenta boas características sensoriais e aceitabilidade. Apresenta ainda, uma das melhores margens de rentabilidade para os fabricantes, uma vez que não exige processo de concentração na sua fabricação. O produto pode ainda ser acrescido de polpas de frutas, purês, aromatizantes, possibilitando maior diversidade de apresentação. Além disso, é um excelente carreador de bactérias probióticas e ingredientes prebióticos. Seu mercado, em suas diversas categorias, vem demonstrando grande potencial de crescimento nos últimos anos (FERREIRA et al., 2001 *apud* ARAÚJO et al., 2012; SANTOS, 1998 *apud* ARAÚJO et al., 2012).

No processo de fermentação do leite para obtenção do iogurte, um cultivo iniciador misto (*St. thermophilus* e *Lb. bulgaricus*) é empregado na matriz. Os micro-organismos se desenvolvem através de um processo simbiótico, onde o *St. thermophilus* se multiplica rapidamente produzindo dióxido de carbono e ácido fórmico. Estes, estimulam a multiplicação de *Lb. bulgaricus* através da redução do pH para seu valor ótimo de crescimento, que por sua vez, produz peptídeos e aminoácidos necessários para a multiplicação do primeiro. Após aproximadamente 3h de fermentação, a proporção de ambos deve

ser a mesma. O processo fermentativo ocorre com o consumo de lactose e hidrólise das proteínas do leite pelo cultivo iniciador, o que resulta na produção de peptídeos e compostos ácidos, como o ácido láctico e acetaldeído (MUCCHETTI; NEVIANI, 2006; OLIVEIRA; DAMIN, 2003; SERAFEIMIDOU, 2012). A produção de ácido láctico, metabólito principal da fermentação durante a multiplicação das BAL, leva à coagulação do leite obtida predominantemente pela redução do pH até o ponto isoelétrico da caseína (pH 4,65) (DOS REIS et al., 2014).

Apesar de os micro-organismos responsáveis pela transformação do leite em iogurte (*St. thermophilus* e *Lb. bulgaricus*) não serem considerados micro-organismos probióticos, uma vez que não são de origem entérica e, de forma geral, não são capazes de aderir e colonizar o trato gastrointestinal, alguns pesquisadores relataram a sobrevivência desses micro-organismos em fezes humanas, o que concorda com a definição vigente de probióticos (CRUZ et al., 2011).

Outros micro-organismos de origem probiótica, por exemplo, as *Bifidobactérias*, podem ser adicionados ao processo com o intuito de agregar funcionalidade. No desenvolvimento de iogurtes suplementados com bactérias probióticas deve haver compatibilidade entre determinadas linhagens que possibilite o desenvolvimento adequado de ambas no produto, evitando problemas de inibição pela produção de ácidos, peróxidos, bacteriocinas e outros metabólitos (CRUZ et al., 2011).

De forma geral, existem três tipos de iogurte: firme, batido e líquido. A principal diferença entre as formas de iogurte apresentadas depende da etapa de rompimento do gel, em maior intensidade para o iogurte líquido, seguido do batido e inexistente no iogurte firme (coágulo compacto). Adicionalmente, para o iogurte firme a fermentação ocorre com o produto dentro das embalagens, enquanto no iogurte líquido e batido, isso não acontece (BYLUND, 2003).

Com o objetivo de valorizar as propriedades físicas do produto (consistência do iogurte firme, viscosidade do iogurte batido e atributos sensoriais, como o sabor e aroma), aumenta-se o teor de sólidos no leite, através do acréscimo de leite em pó, produtos derivados de soro e/ou caseinatos (OLIVEIRA, 2009).

Dentre os leites mais utilizados para a produção de iogurte (bovino, ovino, caprino), o ovino apresenta maior teor de sólidos, conferindo mínima sinérese e alta resistência do gel formado em

iogurtes produzidos a partir desta matéria-prima (BOTTAZZI, 1998; WENDORFF, 2001).

2.3 LEITE OVINO

A produção de leite de ovelhas é fortemente ligada à industrialização de produtos lácteos, como iogurtes, doce de leite e queijos. O leite de ovinos é especialmente propício à transformação industrial devido sua composição de gordura e proteína próximos a 6%, proporcionando alta rentabilidade de produção e produtos lácteos de alto valor agregado. A ovinocultura leiteira segue um padrão comum à agropecuária em diversos segmentos produtivos de diferentes países, a fim de, condicionar a sua dinâmica de crescimento à evolução da indústria e do varejo (CORRÊA; ROHENKOHL; OSÓRIO, 2014a).

A produção de leite de ovelha sucede de raças leiteiras especializadas, como é o caso da Lacaune. A composição média do leite de ovelha da raça Lacaune durante todo seu período de lactação pode variar entre 6,85% a 7,78% para gordura, de 4,61% a 4,86% para proteína, entre 16,43% a 17,37% para extrato seco total e 4,37% a 4,57% para lactose (PELLEGRINI, 2012; NUDDA et al., 2014).

2.3.1 Aspectos Econômicos do Leite Ovino

Dentre os tipos de leite consumidos, o bovino é o mais comum representando cerca de 85% da produção global de leite. No entanto, em muitos países utiliza-se o leite de outras espécies animais, por exemplo, o leite de ovelha. A produção de leite de ovelha no mundo gira em torno de 1,4% da produção de leite global (CLAEYS et al., 2014.; OSMAN et al., 2014).

Nos países que circundam o mar mediterrâneo (por exemplo, Itália, Espanha, França, Portugal, Grécia, Turquia, Israel) e o leste da Europa (especialmente Bulgária e Romênia) o leite de ovelha é parte tradicional e fundamental da economia nacional e os produtos lácteos (por exemplo, iogurte e queijo) são internacionalmente comercializados (NUDDA et al., 2014; PARK et al., 2007 *apud* SILANIKOVE et al., 2010).

Nos principais países produtores de ovinos de zona temperada, a produção de leite não tem destaque, exceto em alguns países europeus. Ásia e Europa, juntos, produzem 79% da produção total de leite de ovelha (TABELA 1), enquanto em base *per capita*, a produção de leite na Europa excede a de qualquer outro continente (ZYGIOYIANNIS, 2006).

Tabela 1. Produção de leite de ovelha

Local	Leite (x 1000 ton)	Contribuição (%)	Leite (kg)/ habitante
Ásia	3586	44,4	0,9
Africa	1641	20,3	1,9
Europa	2812	34,8	3,9
América do Sul	36	0,4	0,1
Mundial	8075	100	1,3

Fonte: Adaptado de Zygyoiannis (2006)

A ovinocultura leiteira no Brasil tem crescido e se destacado nos últimos anos, como uma alternativa para o aumento da receita do produtor de pequenas e médias propriedades, através da produção de queijos finos e iogurtes. A produção de leite em ovinos tem sido vista como uma alternativa sustentável, de baixo investimento inicial e de fácil adoção pela mão de obra familiar, podendo melhorar a qualidade de vida dos pequenos e médios produtores rurais (CORRÊA; ROHENKOHL; OSÓRIO, 2014b).

No Brasil, a ovinocultura leiteira ainda tem pouca expressão no mercado, mas relatos bem sucedidos são encontrados entre os criadores da Serra Gaúcha, que investiram no alto valor agregado do leite ovino (BRITO et al., 2006 *apud* MONTEIRO et al., 2013). Desde o início da colonização do Sul do Brasil, a criação de ovinos vem contribuindo para seu desenvolvimento social e econômico. O sucesso desta atividade decorreu da existência de extensas áreas cobertas por pastagem natural no Estado do Rio Grande do Sul (DA SILVA PEDROSO et al., 2004).

Atualmente, a ovinocultura brasileira é explorada para a produção de leite também nos estados de Santa Catarina e de Minas Gerais, estimando um processamento nacional de cerca de

509.000 litros ao ano, o que corresponde a aproximadamente 526 toneladas (CORRÊA; ROHENKOHL; OSÓRIO, 2014 a).

Apesar de o agronegócio de leite de ovinos ser ainda inexpressivo no Brasil, esta matéria prima tem proporcionado certo interesse pelos institutos de pesquisa, devido seu alto desempenho de processamento e, sua capacidade de ser transformado em produtos lácteos de alta qualidade, atribuindo-lhes sabor e aroma peculiares (BENCINI; PULINA, 1997; GAJO et al., 2012). Com isso, a utilização desta matriz valiosa para a fabricação de derivados lácteos, pode aumentar o retorno financeiro do ovinocultor (SOUZA et al., 2012).

2.3.2 Características Nutricionais do Leite Ovino

Os ovinos são, entre os animais produtores de leite, os que mais sofrem influência do meio ambiente, como pastagem, clima e posição geográfica. A composição do leite de ovelha pode variar com a dieta, raça, animais dentro das várias raças, paridade, sazonalidade, nutrição e condições de manipulação, condições ambientais, localização, e estágio da lactação (HAENLEIN, 2001).

O leite ovino é mais rico em gordura, proteínas, cinzas, cálcio, ferro, manganês, fósforo, zinco, ácidos graxos (AG) de cadeia média, AG monoinsaturados (AGMI), ácido linolênico, todos os aminoácidos essenciais e vitaminas (exceto para caroteno) quando comparado aos leites bovino e caprino (BALTHAZAR et al., 2015; PARK et al., 2007).

Ao comparar o conteúdo mineral dos leites ovino e caprino, o primeiro apresenta maiores teores de magnésio, potássio, sódio, cálcio e ferro. Porém, quando comparado ao bovino, o leite de ovelha possui maiores níveis de cálcio, fósforo, magnésio, zinco, ferro e cobre (KHAN et al., 2006; MAYER; FIECHTER, 2012; PARK et al., 2007; RAYNAL-LJUTOVAC et al., 2008).

Há poucas referências em relação às vitaminas presentes no leite de ovelha. No entanto, alguns estudos demonstraram alto teor de vitamina C e vitaminas do complexo B, especialmente niacina e biotina (MAYER; FIECHTER, 2012; RAYNAL-LJUTOVAC et al., 2008). A Tabela 2 apresenta o teor de micronutrientes presentes nos leites caprino, ovino e bovino.

Tabela 2. Composição de micronutrientes dos leites de cabra, ovelha e vaca

Micronutriente	Leite (100g)		
	Caprino	Ovino	Bovino
Ca (mg)	134	193	122
P (mg)	121	158	119
Mg (mg)	16	18	12
K (mg)	181	136	152
Na (mg)	41	44	58
Cl (mg)	150	160	100
S (mg)	28	29	32
Fe (mg)	0,50	1,22	0,46
Cu (mg)	0,05	0,05	0,06
Mn (mg)	0,03	0,03	0,02
Zn (mg)	0,56	0,57	0,53
I (mg)	0,02	0,02	0,02
Se (µg)	1,33	1	0,96
Vitamina A (IU)	185	146	126
Vitamina D (IU)	2,30	0,18	2
Tiamina (mg)	0,07	0,08	0,05
Riboflavina (mg)	0,21	0,38	0,16
Niacina (mg)	0,27	0,42	0,08
Acido pantotênico (mg)	0,31	0,41	0,32
Vitamina B6 (mg)	0,05	0,08	0,04
Acido fólico (µg)	-	5	5
Biotina (µg)	1,50	0,93	2
Vitamina B12 (µg)	0,06	0,71	0,36
Vitamina C (mg)	1,29	4,16	0,94
Vitamina E (mg)	0,04	0,11	0,11

Fonte: Adaptado de Park et al. (2007) e Raynal-Ljutovac et al. (2008)

A fração de carboidratos no leite é constituída pela lactose. O leite de ovelha apresenta uma composição química mais rica, em todos os seus componentes, exceto no teor de lactose, que é ligeiramente inferior que nos leites caprino e bovino (TABELA 3) (CORRÊA; ROHENKOHL; OSÓRIO, 2014b; JANDAL, 1996; PARK et al., 2007).

Tabela 3. Comparação de valores dos componentes básicos dos leites ovino, caprino e bovino

Espécie	Composição (%)					Referências
	Gordura	Lactose	Proteína	Caseína	Cinzas	
Ovino	7,62	3,7	6,21	5,16	0,9	Jandal (1996)
	7,9	4,9	6,2	4,2	0,9	Park et al. (2007)
	8,5	4,5	-	5,5	-	Corrêa et al. (2014)b
	5,1	3,85	6,38	-	1	Dibbern et al. (2013)
Caprino	3,8	4,08	2,90	2,47	0,79	Jandal (1996)
	3,8	4,1	3,4	2,4	0,8	Park et al. (2007)
	4,2	4,3	-	4	-	Corrêa et al. (2014)b
Bovino	3,67	4,78	3,23	2,63	0,73	Jandal (1996)
	3,6	4,7	3,2	2,6	0,3	Park et al. (2007)
	3,5	4,7	-	4,3	-	Corrêa et al. (2014)b

Fonte: A autora

No que se refere ao percentual lácteo, o leite de ovelha contém quase duas vezes mais proteínas que os de cabra e vaca, sendo as caseínas majoritárias no leite de ovelha (15-85% do total de proteínas). Quanto as proteínas do soro do leite, estas constituem, cerca de 17 a 22% do total de proteínas, sendo lactoglobulina e lactoalbumina majoritárias (CORRÊA; ROHENKOHL; OSÓRIO, 2014b).

Por ser um alimento de alto valor biológico e de alta digestibilidade, hipoalergenicidade e alcalinidade (BALTHAZAR et al., 2015), o leite de ovelha tem sido proposto como uma alternativa para lactentes intolerantes ao leite de outras espécies.

O leite ovino possui menores glóbulos de gordura ($\approx 3,30 \mu\text{m}$) quando comparados aos do leite de vaca ($\approx 4,50 \mu\text{m}$), proporcionando maior digestibilidade. Além disso, o leite de ovelha também é favorecido pela sua composição de AG, que inclui uma maior proporção de ácidos graxos saturados (AGS) de cadeia curta e média, que são facilmente metabolizados como energia e não incidem sobre o colesterol (CORRÊA; ROHENKOHL; OSÓRIO, 2014b; MAYER; FIECHTER, 2012).

De modo geral, a gordura láctea é complexa e possui propriedades físicas e nutricionais exclusivas, por exemplo, a produção do ácido rumênico (18:2 *cis*-9, *trans*-11) um dos isômeros conjugados do AL (GOLAY et al., 2007). Estudos recentes têm mostrado que os isômeros de CLA presente em produtos lácteos, melhora a saúde humana através de suas propriedades anti carcinogênicas (THUILLIER et al., 2013), anti diabéticas (MALINSKA et al., 2015), anti ateroscleróticas (STACHOWSKA et al., 2012), anti osteoporóticas (DE GUIRE et al., 2012), bem como, prevenção do aumento da massa de gordura corporal (CHEN et al., 2012) e sua função estimuladora do sistema imunológico (BASSAGANYA-RIERA et al., 2012). Entre os ruminantes, a gordura do leite de ovelha contém o mais alto nível de CLA (TABELA 4) e também, o maior teor de ácido vacênico (AV), seu precursor fisiológico (JAHREIS et al., 1999; TSIPLAKOU; MOUNTZOURIS; ZERVAS, 2006).

Tabela 4. Porcentagem de CLA (C18:2 *cis*-9, *trans*-11) no leite de animais ruminantes

Animal	CLA (% EMAG total)
Cabra	0,64 ± 0,15
Vaca	1,01 ± 0,25
Ovelha	1,08 ± 0,32

Fonte: Adaptado de Jahreis et al. (1999)

De acordo com Parodi (2003) *apud* Nunes e Torres (2010), o teor de CLA no leite e seus derivados pode variar de 2 a 37 mg/g de lipídios. Na primavera, o leite de ovelha apresenta, entre 30 e 44% mais de concentração em CLA que outras estações do ano. O efeito do clima está vinculado à alimentação dos animais ruminantes (DE CAMPOS, 2011; TSIPLAKOU; MOUNTZOURIS; ZERVAS, 2006), pois o CLA tem origem no rúmen a partir do pasto ingerido. Por outro lado, nenhum outro fator como raça, paridade, ou dias em lactação podem afetar significativamente o teor do CLA na gordura do leite (TSIPLAKOU; MOUNTZOURIS; ZERVAS, 2006).

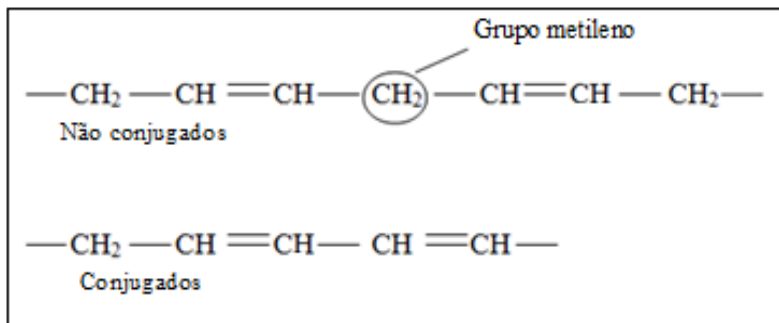
2.4 SÍNTESE DE CLA

O acrônimo CLA é usado para descrever uma família de isômeros do ácido octadecadienóico (C18:2). O CLA pode ser formado por bactérias anaeróbicas no rúmen, como um intermediário na biohidrogenação do AL ou na glândula mamária, através da dessaturação do AV (C18:1 *trans*-11) a partir da enzima $\Delta 9$ -desaturase (KEPLER et al., 1966; SERAFEIMIDOU et al., 2012).

Em geral, as ligações duplas nos ácidos graxos poliinsaturados (AGPI) estão separadas por um grupo metileno, para evitar a oxidação quando expostos em meio contendo oxigênio. Os AGPI também podem apresentar ligações duplas conjugadas, ou seja, sem o grupo metileno. O sistema de ligações duplas encontra-se alternado, resultando na isomerização das ligações duplas em configuração conjugada. A presença de ligações duplas conjugadas ou separadas pelo grupo metileno (FIGURA 1) e, de diferentes isomerias (posicionais e geométricas), pode proporcionar modificações às propriedades

físico-químicas e nutricionais dos AG (MOTTA, 2003; BLOCK; BARRERA-ARELLANO, 2009).

Figura 1. Ligações duplas isoladas e conjugadas

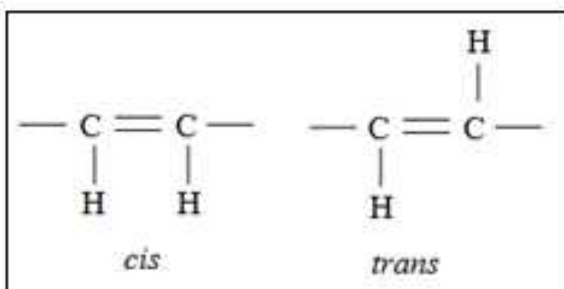


Fonte: Adaptado de Block e Barrera-Arellano (2009)

Para minimizar os efeitos tóxicos dos AG obtidos da alimentação, sobre a fermentação ruminal, as bactérias lipolíticas secretam lipases como, a ácido linoléico isomerase para liberar os AGI (PARODI, 1999). No rúmen os lipídios sofrem transformações pelas lipases microbianas em um processo chamado de lipólise (considerado como pré-requisito para acontecer a biohidrogenação). Em seguida, os ácidos graxos poliinsaturados (AGPI) são rapidamente hidrogenados pelos micro-organismos, resultando na produção de ácidos graxos saturados (AGS), principalmente ácido esteárico (C18:0). Esse processo converte os AGI em AGS via isomerização de AGT intermediários, seguido pela hidrogenação das ligações duplas. O grau de lipólise e biohidrogenação dependem do tipo e da quantidade de gordura recebida pelo rúmen (JENKINS et al., 2008).

Resumidamente, a síntese de CLA inicia especificamente com a isomerização dos ácidos graxos insaturados (AGI), convertendo os isômeros nativos *cis* em isômeros *trans* (FIGURA 2), seguida da biohidrogenação pelas bactérias do rúmen (KIM et al., 2009).

Figura 2. Isômeros geométricos de AG (configurações *cis* e *trans*)

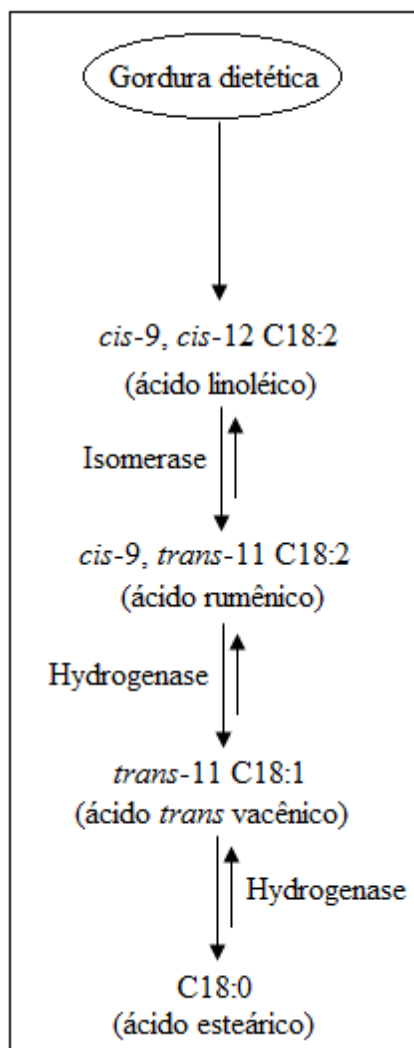


Fonte: Adaptado de Gómez-Ayala (2009)

Segundo De Holanda, De Holanda e Mendonça (2012) o processo de biohidrogenação do AL (C18:2) ocorre em três etapas. Primeiro a isomerização da dupla ligação *cis*-12 para configuração *trans*-11, formando um AG dienóico ou trienóico conjugado; seguido por uma reação de redução da dupla ligação *cis*-9, formando o AV (C18:1, *trans*-11) e finalmente, uma segunda reação de redução catalisada por micro-organismos secundários, os quais hidrogenizam a ligação *trans*-11 do AV, formando o ácido esteárico (C18:0) (FIGURA 3).

Uma questão interessante pode ser levantada sobre o motivo pelo qual as bactérias tenham desenvolvido a capacidade enzimática para realizar biohidrogenação. A resposta se baseia no fato de que a biohidrogenação possa ser um mecanismo de desintoxicação (GORISSEN et al., 2011). Esta questão não é puramente acadêmica, porque este mecanismo pode ser a chave para encontrar métodos para manipular a biohidrogenação de uma forma previsível (JENKINS et al., 2008).

Figura 3. Principais rotas metabólicas da biohidrogenação do ácido linoléico



Fonte: Adaptado de Khanal e Dhiman (2004)

2.4.1 Produção de CLA por BAL

Kepler et al. (1966) examinaram a via de biohidrogenação do AL pela bactéria ruminal *Butyrivibrio fibrisolvens*. A produção de CLA pelas bactérias do rúmen levou à especulação de que outros micro-organismos também poderiam ser capazes de sintetizar este metabólito (LUCATTO; MENDONÇA; DRUNKLER, 2014). Diversos estudos revisados por Gorissen et al. (2015) reportaram a produção de CLA durante a fermentação láctea por BAL. De acordo com tais estudos, além da capacidade de alterar o perfil de AG do leite, algumas cepas bacterianas produzem AG funcionais durante a fermentação como o resultado de seu crescimento e metabolismo.

Existem fatores que influenciam a produção de CLA pelas BAL, dentre eles, estudos apontam as variáveis tempo e temperatura de fermentação, concentração protéica e substrato oleoso (fonte de AL) (GHOLAMI; KHOSRAVI-DARANI, 2014; TERÁN et al., 2015). Desta forma, alguns autores têm investigado os fatores que podem influenciar a produção de CLA durante a fermentação láctea e investido em estratégias para aperfeiçoar o processo de conversão de AL em CLA (TABELA 5).

Lin, Lin e Lee (1999) afirmaram a necessidade da presença de uma fonte de AL ao meio para aumentar a formação de CLA pelas BAL. Em controvérsia, Pandit et al. (2012) destacaram 20 BAL capazes de produzir AL no leite (0,43-1,12 g/AG) sem adição de qualquer substrato gorduroso.

Jiang, Björck e Fonden (1998) identificaram 19 cepas, comumente utilizadas como cultivos iniciadores, com habilidade para produzir CLA a partir de AL. Os autores observaram que ao adicionar uma concentração de 25 µg/mL de AL no meio, o crescimento da maioria das cepas foi inibido. Entretanto, notou-se uma relação positiva entre a formação de CLA e tolerância ao AL, o que confirma a alusão prévia de que a produção de CLA possa funcionar como um mecanismo de desintoxicação.

Tabela 5. Estratégias para aumentar a produção de CLA pelas bactérias lácticas

Micro-organismo	Fonte de AL		Tempo de Fermentação (h)	Concentração de CLA	Referências
	Substrato	µg/mL			
<i>Lc. lactis</i>	OG	200	12	8,5 mg/g ^a	Kim e Liu (2002)
<i>Lb. casei</i>	AL	400	24	175,2 µg/mL ^a	Van-Nieuwenhove et al. (2007)
<i>Lb. rhamnosus</i>	AL	200	24	190,2 µg/mL ^a	
<i>St. thermophilus</i>	AL	800	24	198,6 µg/mL ^a	
<i>Lb. bulgaricus</i>	AL	5000	48	86 µg/mL ^b	
<i>Lb. acidophilus</i>	AL	1000	24	106,5 µg/mL ^b	Lin, Lin e Lee (1999)
<i>St. thermophilus</i>	AL	5000	48	82,5 µg/mL ^b	
<i>Lb. plantarum</i>	AL	3000	24	240,69 µg/mL ^c	Khosravi et al. (2015)
<i>Lb. rhamnosus</i>	OSH	1%	24	310 µg/g ^a	
<i>Lb. acidophilus</i>	OSH	1%	24	450 µg/g ^a	Xu, Boylston e Glatz (2005)
<i>Lb. casei</i>	OSH	1%	24	480 µg/g ^a	
<i>Lb. plantarum</i>	OSH	1%	24	510 µg/g ^a	
<i>P. shermani</i>	OSH	1%	24	1450 µg/g ^a	
CI	OSH	1%	24	710 µg/g ^a	Khosravi-Darani, Reihani e Feili (2014)
CI + (<i>Lb. acidophilus</i> , <i>B. bifidum</i> e <i>P. freudenreichii</i>)	OSU	4%	27	11,03 mg/g ^a	

Fonte: A autora

Legenda: OG = óleo de girassol; OSH = óleo de soja hidrolisado; OSU = óleo de semente de uva; CI = Cultivo iniciador de iogurte (*St. thermophilus* + *Lb. bulgaricus*, 1:1). CLA total^a; isômero C18:2 *cis*-9, *trans*-11^b; não especificado^c

Kim e Liu (2002) testaram 14 BAL por sua capacidade em produzir CLA utilizando óleo de girassol (70% de AL) como substrato. *Lc. lactis* I-01 apresentou a maior produção de CLA (acima de 4 mg/g de lipídio) sendo selecionada para estudos posteriores, afim de identificar os fatores e processos responsáveis pelo aumento de CLA em leite fermentado. A maior concentração de CLA (8,5 mg/g de lipídio) foi detectada com 0,2 g/L de óleo de girassol, 3% de leite em pó, 6% de glicose e 12 h de incubação. Os resultados demonstraram ainda, que a formação de CLA no leite fermentado pode ser afetada por vários fatores, dentre eles, o biotipo bacteriano, o número de células inoculadas, o período de incubação a pH neutro e a concentração do substrato.

Cepas de BAL (*Lb. acidophilus*, *Lb. lactis*, *Lc. cremoris*, *Lc. lactis*, *Lb. bulgaricus* *St. thermophilus*) foram inoculadas, individualmente, em meio de crescimento suplementado com 12% de leite em pó e, avaliadas sob diferentes concentrações de AL (1000 ou 5000 µg/mL) e tempo de incubação (0, 24 e 48 h), a fim de selecionar a melhor condição para formação de CLA por cada micro-organismo. A produção de CLA durante as primeiras 24 h de fermentação foi significativamente diferente comparada ao tempo de incubação prolongado (48 h), para as culturas *Lb. bulgaricus* (de 66 para 86 µg/mL) e *St. thermophilus* (de 57 para 82,5 µg/mL) suplementadas com 5000 µg/mL de AL (LIN; LIN; LEE, 1999). No entanto, outros autores não obtiveram êxito na produção de CLA em caldo MRS suplementado com 100 ou 200 µg/mL de AL ao inocular *Lb. bulgaricus* a 37 °C por 12 ou 24 h de fermentação (KIM; LIU, 2002; VAN NIEUWENHOVE et al., 2007).

A habilidade de diferentes cepas de *Lactobacillus* em produzir CLA a partir de AL foi também estudada por Khosraviet al. (2015). Experimentos preliminares revelaram que *Lb. plantarum* mostrou maior potencial em produzir CLA (95,25 µg/mL). A metodologia de superfície de resposta foi aplicada para investigar o efeito de três variáveis independentes (AL, concentração de extrato de levedura e densidade do inóculo) sobre a formação de CLA. As condições ótimas para atingir a maior produção de CLA (240,69 µg/mL) foram obtidas utilizando 3 mg/mL de AL; 4 g/L de extrato de levedura e 4% (v/v) densidade do inóculo.

Xu, Boylston e Glatz (2005) avaliaram a formação de CLA em produtos lácteos fermentados a partir de óleo de soja hidrolisado. Os autores testaram cepas probióticas individualmente ou em co-cultura com cultura mista (1:1) de *Lb. bulgaricus* e *St. thermophilus* (cultura tradicional de iogurte). Após 14 dias sob refrigeração encontrou-se um aumento superficial no teor de CLA nos tratamentos com cultura de iogurte. Os maiores teores de C18:2 *cis*-9, *trans*-11 (0,97 mg/g de lipídios) e C18:2 *trans*-10, *cis*-12 (0,71 mg/g de lipídios) foram encontrados nas amostras fermentadas com *Lb. rhamnosus* com cultura de iogurte.

Em um estudo similar, iogurtes de leite de vaca e de ovelha foram investigados por alterações na concentração de CLA durante 14 dias a 5 °C. O armazenamento refrigerado resultou num decréscimo significativo de CLA nos iogurtes de leite de vaca e um significativo aumento nos iogurtes de leite de ovelha, sugerindo que o teor de CLA foi influenciado pela origem do leite (SERAFFEIMIDOU et al., 2013).

2.5 CLA E BENEFÍCIOS À SAÚDE

Estudos demonstram estimativas na ingestão dietética de CLA/dia por homens e mulheres de vários países. O consumo médio varia de 0,2 a 1,5 g/adulto/dia parece depender do gênero e origem da fonte de CLA (animal ou vegetal) (AKOH; MIN, 2008; RITZENTHALER et al., 2001; HERBEL et al., 1998; PARK et al., 1999). Dentre os grupos populacionais relatados, a ingestão de CLA pela população brasileira (36 mg/dia) está dentre as menores.

Várias pesquisas têm sido desenvolvidas para determinar as propriedades fisiológicas, bioquímicas e físicas dos isômeros de CLA. Os avanços na literatura indicam que os isômeros de CLA possuem potentes atividades biológicas que os destacam em benefícios para a saúde humana (QUADRO 1) (WATKINS et al., 2003).

Quadro 1. Atividades biológicas dos isômeros de CLA

Isômero	Atividade Biológica	Referência
C18:2 <i>cis</i> -9, <i>trans</i> -11; <i>trans</i> -10, <i>cis</i> -12 (1:1)	Inibitória no desenvolvimento de câncer de mama, pele, estômago, intestino	Ip et al. (1991), Ip et al. (1994) e Ip et al. (1999)
	Antioxidante	Ip et al. (1991)
	Imunorreguladora	Bassaganya-Riera et al. (2012)
	Redutora da massa gordurosa corporal	Laso et al., (2007) e Chen et al. (2012)
	Redutora da circunferência abdominal sagital (cm)	Risérus et al. (2001) e Malinska et al. (2015)
	Moduladora da resposta inflamatória	Belury (2002)
	Estimuladora da massa magra corporal	Gaulier et al. (2006)
	Redutora da glicemia	Malinska et al. (2015)
	Redutora da massa gordurosa em região corporal específica (pernas) e relação cintura-quadril	Gaulier et al. (2006)
C18:2 <i>cis</i> -9, <i>trans</i> -11	Positiva sobre marcadores bioquímicos relacionados ao mal de Alzheimer	Barbosa (2009) e Gama et al. (2015)
	Antiosteoporótica	Deguire et al. (2012)
	Antiaterosclerótica	Stachowska et al. (2012)
C18:2 <i>trans</i> -10, <i>cis</i> -12	Inibitória no desenvolvimento de câncer de ovário	Thuillier et al. (2013)
	Inibitória no desenvolvimento de câncer de próstata	Ochoa et al. (2004)

Fonte: A autora

De acordo com o estudo de Ip et al. (1991), a suplementação de 0,5% de CLA na dieta de ratos, foi suficiente para reduzir o desenvolvimento de tumor mamário. O CLA foi considerado o AG mais ativamente influente na modulação tumoral. Porém, ao relacionar a dose de CLA com atividade antioxidante em ratos, Ip et al. (1999) observaram máxima eficiência aplicando 0,25% de CLA na dieta dos animais. Estes resultados sugerem uma discrepância entre efetividade antioxidante e anti-carcinogênica.

Em ensaio realizado por Ip et al. (1994), uma dose diária de 3 g de CLA foi recomendada para inibir os efeitos carcinogênicos em glândula mamária de ratas. Animais com peso aproximado de 350 g foram alimentados com 0,1% de CLA na dieta (representado cerca de 0,015 g de CLA/ dia, equivalente a uma dose diária de 3 g de CLA numa extrapolação direta a uma pessoa de 70 kg), uma quantidade ligeiramente mais elevada em relação ao consumo estimado.

Os mecanismos moleculares da bioatividade do CLA têm sido atribuídos à sua capacidade de modular a formação de eicosanóides e a expressão gênica. Poucos estudos clínicos têm sido conduzidos em humanos (DAMODARAN; PARKIN; FENNEMA, 2010). Apesar disso, Tvrzicka et al. (2011) reportaram diversos experimentos *in vitro* e *in vivo* relatando as propriedades antioxidantes e efeitos anticarcinogênicos dos isômeros de CLA. Além disso, Ochoa et al. (2004) e Ip et al. (1999) também relataram os efeitos inibitórios do CLA sobre câncer de mama, pele, estômago, intestino e próstata.

No estado da arte, diferentes estudos revisados por Belury (2002) e Pariza, Park e Cook (2001) demonstraram a capacidade do CLA em modular a resposta inflamatória e restaurar a sensibilidade à insulina em animais portadores de Diabetes do tipo-II. Mais recentemente, essa atividade de modular a resposta inflamatória atribuída ao CLA, demonstrou uma influência positiva sobre os marcadores bioquímicos associados à doença de Alzheimer.

Barbosa et al. (2009) reportaram redução da atividade de diferentes de fosfolipases (A_2) no cérebro de ratos. PLA_2 (subtipo de A_2) é uma família de enzimas hidrolíticas que são mediadores importantes na transmissão e processamento de sinais neuronais e na regulação de outras atividades cerebrais. Quarenta e oito

animais foram alimentados com três dietas diferentes ao longo de um período de trinta dias. Os resultados do estudo sugerem que uma dieta enriquecida com 60% de CLA (30% de C18:2 *trans*-10, *cis*-12 e 30% de C18:2 *cis*-9, *trans*-11) pode ser um potencial nutracêutico para a prevenção e/ou inibição da progressão da doença de Alzheimer.

Gama et al. (2015) analisaram os dados de trinta ratos alimentados com diferentes doses de CLA (0,72 e 1,98 g/100 g de gordura total) durante quatro semanas. Os tratamentos consistiram de uma dieta livre de CLA e demais dietas contidas de manteiga enriquecida com CLA (C18:2 *cis*-9, *trans*-11). Comparada ao grupo da dieta controle, a atividade hipocampal da PLA₂ dos grupos alimentados com CLA, apresentou melhor desempenho. Tais achados sugerem que produtos lácteos enriquecidos com CLA (C18:2 *cis*-9, *trans*-11) podem ser úteis no tratamento do mal de Alzheimer.

Um estudo *in vivo* avaliou os efeitos de AGT industrializados (AGTi) e CLA sobre os marcadores de inflamação e de *stress* oxidativo em 61 adultos saudáveis. Os autores observaram um efeito positivo nos marcadores de inflamação e em um dos marcadores de *stress* oxidativo nos voluntários que consumiram uma mistura de isômeros de CLA (80% C18:2 *cis*-9, *trans*-11 e 20% C18:2 *trans*-10, *cis*-12) na dieta (SMIT et al., 2011).

Recentemente, Malinska et al. (2015) pesquisaram ratos hipertriacilglicerolêmicos (HHTg) alimentados com dietas enriquecidas com uma mistura de isômeros de CLA (1:1, C18:2 *cis*-9, *trans*-11; *trans*-10, *cis*-12) ou óleo de girassol (grupo controle) por dois meses. Os ratos que consumiram CLA na dieta demonstraram decréscimo de gordura visceral ($p < 0,01$) e redução do acúmulo de triacilglicerol no fígado, músculos e aorta. Além disso, ao comparar àqueles animais alimentados com óleo de girassol, os ratos suplementados com CLA apresentam maior sensibilidade à insulina. Os autores concluíram que o CLA pode proteger contra dislipidemia induzida por HHTg, deposição ectópica de lipídios e resistência à insulina.

De Guire et al. (2012) mencionaram uma associação entre CLA com a membrana de eritrócitos e composição óssea. Cinquenta e quatro homens (idade entre 19-53 anos) foram testados num estudo transversal para examinar a associação entre

o perfil celular e a composição óssea. A pesquisa transcorreu num ensaio dose-resposta de 1 a 3 grupos constituídos por: placebo (controle); 1,5 g/dia ou 3,0 g/dia de CLA (C18:2 *cis*-9, *trans*-11) durante um período de 16 semanas. A densidade mineral óssea foi significativamente maior no grupo alimentado com 3,0 g de CLA comparado ao com 1,5 g, enquanto que, o grupo placebo não apresentou alteração significativa em nenhuma variável o decorrer do experimento.

Estudos com indivíduos obesos propuseram uma ingestão de 3 a 4 g/dia de CLA para produzir perda de massa gordurosa corpórea em humanos (BLANKSON et al., 2000; RISÉRUS; BERGLUND; VESSBY, 2001; GAULIER et al., 2004; LASO et al., 2007; WHIGHAM, WATRAS, SCHOELLER, 2007). Apesar de o isômero C18:2 *trans*-10, *cis*-12 ter sido associado com efeitos antiadipogênicos em seres humanos, esses resultados são menos significativos e mais ambíguos quando comparados aos ensaios realizados com animais (WANG; JONES, 2004). Contudo, cientistas acreditam que ao considerar o corpo como um todo, o isômero C18:2 *trans*-10, *cis*-12 poderia ser um importante aliado no controle do ganho de peso da população adulta se consumido continuamente a longo prazo, já que aparenta não atribuir efeitos adversos (BHATTACHARYA et al., 2006; WHIGHAM; WATRAS; SCHOELLER, 2007).

2.6 CLA E POTENCIAL ALEGAÇÃO DE FUNCIONALIDADE

A indústria farmacêutica oferece uma ampla gama de fármacos para tratar muitas patologias, porém, existe uma crescente tendência no uso de alimentos e alguns de seus ingredientes bioativos como alternativa ou complemento à medicina convencional. O consumo de determinados alimentos, incluindo certas frutas, legumes e produtos fermentados (especialmente os produtos lácteos) tem sido recomendado para a obtenção de uma dieta saudável, pois além de fornecer nutrientes essenciais ao organismo, estes podem evitar e/ou combater muitas patologias crônicas (KANEKANIAN, 2014).

Na década de 1980, foi introduzido no Japão o termo “alimentos funcionais” (FOSHU do inglês – *foods for specified health use*) para caracterizar uma nova concepção de alimentos

que integram propriedades medicinais, para diminuir os custos dos estados com a saúde da população. Os alimentos funcionais são aqueles que, além de contribuir com o aporte nutricional, contêm substâncias que podem ser consideradas biologicamente ativas (biomodulação), produtoras de benefícios de saúde. Estes podem reduzir potencialmente o risco de algumas patologias ocorrerem e auxiliar em funções fisiológicas do organismo (DE DEA LINDNER et al., 2013).

Nos últimos anos o leite, os produtos lácteos e, determinados componentes de origem láctea (*e.g.* proteína de soro de leite) têm-se destacado no segmento dos alimentos funcionais. Dentre os alimentos funcionais de origem láctea, destacam-se as proteínas do soro (α -lactalbumina, β -lactoglobulina, lactoferrina, lactoperoxidase), os peptídeos bioativos e os produtos fermentados com as BAL e *Bifidobactérias* potencialmente probióticas. Além dos citados acima, incluem-se nesta categoria alguns AG, dentre eles CLA. O CLA é o componente bioativo mais importante na gordura do leite e tem recebido particular atenção (ALHAJ; KANEKANIAN, 2014).

O panorama do mercado mundial destes produtos funcionais tem potencializado desde a percepção dos consumidores sobre a necessidade de ingestão destes produtos. Neste contexto, atualmente é possível encontrar variedades de bebidas lácteas fermentadas, iogurtes, queijos e sorvetes com caráter funcional. O valor do mercado global de alimentos funcionais em 2013 foi de US\$ 168 bilhões podendo chegar a mais de US\$ 300 bilhões em 2020, com crescimento médio anual de mais de 8,5% (RESEARCH AND MARKETS, 2015).

O CLA atraiu considerável atenção após vários experimentos *in vivo* terem afirmado importantes propriedades fisiológicas desta molécula. Após a relação do teor de CLA presente nos produtos lácteos e seus benefícios sobre a saúde humana, incluindo propriedades anti-câncer (THUILLIER et al., 2013), anti-diabética (MALINSKA et al., 2015), antiaterosclerótica (STACHOWSKA et al., 2012), anti-osteoporose (DEGUIRE et al., 2012), bem como na prevenção do aumento da gordura corporal (CHEN et al., 2012) e função como estimulador do sistema imunológico (BASSAGANYA-RIERA et

al., 2012), esta molécula passou a ser objeto de estudo em diversos campos de aplicação.

De acordo com a legislação brasileira, propriedade funcional de um alimento é aquela relativa ao papel metabólico ou fisiológico que o nutriente ou não nutriente tem no crescimento, desenvolvimento, manutenção e outras funções normais do organismo humano (BRASIL, 1999a). O Ministério da Saúde, através da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), regulamentou os alimentos funcionais através das resoluções 16, 17 e 19 (BRASIL, 1999b; 1999c; 1999d). O CLA teve sua comercialização proibida no Brasil pela ANVISA através do Informe Técnico nº 23 de 2007, alegando que as atuais evidências científicas não comprovam a segurança e a eficácia do uso (BRASIL, 2007).

Segundo a *Food and Drug Administration* (FDA) os isômeros de CLA foram considerados seguros para o consumo humano em 11 de julho de 2008, recebendo o título de *Generally Recognized As Safe* (GRAS), sob o código GRN 00232, devido às alegações científicas de supressão inflamatória do intestino e melhoramento da capacidade de resposta específica para o antígeno de células T contra agentes patogênicos virais e bacterianos (BASSAGANYA-RIERA; HONTECILLAS, 2010).

Um parecer científico sobre uma lista de alegações de saúde nos termos do artigo 13 do Regulamento (CE) n.º 1924 de 2006, foi solicitado ao Painel dos Produtos Dietéticos, Nutrição e Alergias pela Comissão Européia. Este parecer abordou a fundamentação científica das alegações de saúde em relação aos isômeros de CLA e a contribuição para a manutenção ou efetivação do peso corporal normal; aumento da massa corporal magra; aumento da sensibilidade à insulina; proteção do DNA, proteínas e lipídios a danos oxidativos e contribuição para as defesas imunitárias por estimulação da produção de anticorpos protetores em resposta à vacinação. A fundamentação científica baseou-se na informação fornecida pelos Estados-membros na lista consolidada do Artigo 13, alegações de saúde e nas referências que a EFSA recebeu de Estados-membros ou diretamente a partir de partes interessadas. O constituinte alimentar que foi o objeto das reivindicações da saúde é uma mistura equimolar dos isômeros C18:2 *cis*-9, *trans*-11 e C18:2*trans*-10, *cis*-12. O Painel considerou que uma mistura

equimolar dos isômeros foi suficientemente caracterizada (EFSA, 2010).

A *Food and Drugs Act* (canadense), através da sua definição de alimentos e medicamentos, restringe reivindicações relacionadas à saúde para alimentos, ingredientes alimentares e alimentos naturais promotores de saúde (NHP do inglês – *natural health products*). Os órgãos de saúde do Canadá desenvolveram regulamentos relacionados ao subsídio de alegações de saúde para isômeros conjugados de AL. Para fins de rotulagem nutricional, a mistura dos dois isômeros de CLA mais abundantes (C18:2 *cis*-9, *trans*-11 e C18:2 *trans*-10, *cis*-12) não foram considerados como gordura *trans*. Portanto, não é obrigatório declarar no rótulo o conteúdo de isômeros de CLA na informação nutricional de gordura *trans* (FITZPATRICK, 2004).

A ingestão diária de isômeros de CLA tem sido estimada em vários países através de diferentes técnicas (aplicação de inquéritos alimentares de âmbito nacional, questionários de frequência alimentar; estimativas dietéticas e registros alimentares de sete dias). O consumo diário pode variar de 0 a 500 mg/pessoa, na maioria dos países estudados, sendo considerado um valor muito baixo (BLOCK; BARRERA-ARELLANO, 2009). Para suprir esta carência, suplementos alimentares de CLA são comercializados principalmente como cápsulas gelatinosas nos Estados Unidos, Canadá, China e em alguns países europeus (QUADRO 2).

Quadro 2. Suplementos alimentares comerciais de CLA (não exaustiva)

Produto TM	Marca	Local
VEGE-CLA liquid Veggie-Gels	North Coast Naturals	Canadá
CLA Maxx	Maxx Essentials	Canadá
CLA 1000	PVL Essentials	Canadá
Tonalin CLA	SISU	Canadá
CLA Conjugated linoleic acid	BIOVEA	USA
Tonalin CLA	Nature's Bounty	USA
Lipo 6 CLA	Nutrex Research	USA
Mega CLA	Gold Nutrition	Portugal
CLA Softgel	VitaOn	China

Fonte: A autora

Uma alternativa aos suplementos comerciais, geralmente menos tolerados do que os próprios alimentos no suprimento de nutrientes, é o aumento do teor de CLA nas fontes alimentares. Trata-se de uma abordagem prática, uma vez que não há alterações nos componentes da dieta e nem aumento no consumo diário de colesterol e gordura saturada. O aumento do teor de CLA aos derivados lácteos agrega valor nutricional e terapêutico aos produtos, podendo apresentar um peso mercadológico apreciável.

2.7 MÉTODOS ANALÍTICOS PARA QUANTIFICAÇÃO DE CLA

A perspectiva de manipular a gordura do leite visa atender à demanda de um mercado consumidor que, busca agregar propriedades de saúde à alimentação, atento especialmente no que se refere à ingestão de alimentos ricos em gorduras. Diante dessa nova realidade, surge a necessidade de investigar o perfil de AG presentes na gordura do leite, uma vez que a quantidade e a composição destas são parâmetros passíveis de manipulação (MENESES et al., 2015).

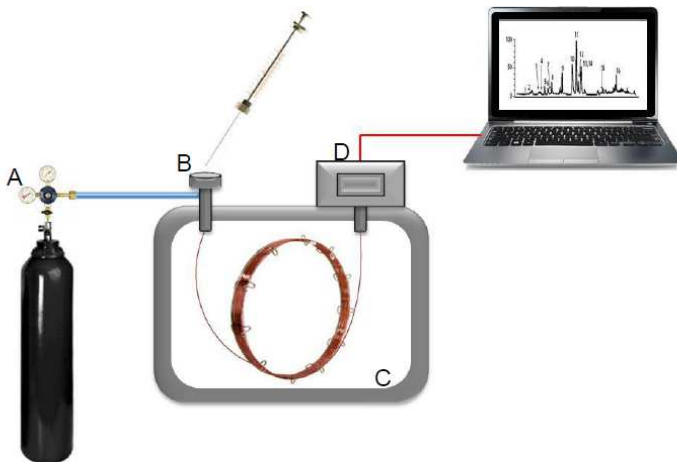
A Cromatografia a gás (CG) fornece a base para a maioria das abordagens analíticas, embora outras técnicas como a CG acoplada à espectrometria de massa (CG-MS); cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE); ressonância magnética nuclear (RMN) e infravermelho com transformada de Fourier (IVTF), também sejam valiosas para separar os isômeros de CLA (CRISTIE; SÉBÉDIO; JUANÉDA, 2001).

2.7.1 Cromatografia a gás

A principal técnica empregada para determinar e quantificar os isômeros de CLA é a CG com detecção por ionização de chama (CG/DIC) (GOUVÊA et al., 2012). A CG é um método físico de separação dos componentes de uma mistura através de uma fase móvel gasosa inerte carregada sobre uma fase estacionária. Esta técnica é utilizada para a separação de compostos voláteis ou volatilizáveis, ou seja, os compostos a serem analisados devem apresentar razoável pressão de vapor à temperatura de separação (SKOOG et al., 2006). Um

equipamento de CG pode ser dividido em quatro partes principais: suprimento de gás de arraste, sistema de injeção da amostra, colunas e forno da coluna e sistema de detecção (FIGURA 4).

Figura 4. Representação esquemática de um equipamento de CG



Fonte: Porto (2015)

Legenda: A: suprimento de gás de arraste; B: sistema de injeção da amostra; C: coluna e forno da coluna; D: sistema de detecção

Os gases de arraste mais comumente utilizados são o hidrogênio, hélio, nitrogênio ou argônio, por serem quimicamente inertes. A injeção da amostra ocorre através de uma micro seringa. A amostra é injetada em vaporizador instantâneo a 50 °C acima da temperatura de vaporização do componente menos volátil presente na amostra. O vaporizador localiza-se no topo da coluna cromatográfica. As colunas capilares podem medir de 2 até 100 m de comprimento proporcionando assim análises mais rápidas. Estas devem permanecer em altas temperaturas a fim de, manter os analitos em estado gasoso após a injeção, desta forma, encontram-se no interior de um forno com temperatura controlada. O detector localizado na saída da coluna quantifica os componentes separados, presentes na corrente do gás de arraste que elui da coluna. Um dos detectores mais utilizados é o detector por ionização em chama (DIC). Quando compostos orgânicos são

introduzidos na chama através da coluna leva à pirólise a maioria dos compostos de carbono presentes no fluxo de hidrogênio, produzindo íons e elétrons capazes de conduzir eletricidade, que é coletada em um eletrodo e produzem um aumento na corrente elétrica proporcional à quantidade de carbono que passou pela chama. O resultado dessa corrente é amplificado por um eletrômetro, convertido e registrado (PORTO 2015).

Para análise dos isômeros de CLA, geralmente as colunas utilizadas são as de 100 m, além disso, a composição da coluna deve conferir alta polaridade. As colunas mais tradicionalmente empregadas são as de nome comercial SP2560 e CP-SIL88, compostas por cianopropilsiloxano (DELMONTE et al., 2011). Os isômeros de CLA eluem muito tempo depois dos dienos não conjugados, e os isômeros posicionais relevantes emergem na ordem *cis*-9, *trans*-11 < *trans*-10, *cis*-12 (CRISTIE; SÉBÉDIO; JUANÉDA, 2001).

2.7.2 Preparo da amostra

O preparo da amostra consiste em duas etapas principais: a extração dos lipídios totais e posterior derivatização dos ácidos carboxílicos aos seus ésteres metílicos correspondentes (metilação) para, aumentar a volatilidade da amostra e evitar a adsorção de solutos na coluna.

A extração a frio é um método frequentemente utilizado por pesquisadores. As vantagens dessa técnica englobam a extração de todas as classes lipídicas, minimizando as reações de oxidação e, não requer equipamentos sofisticados, além disso, o extrato obtido pode ser utilizado em análises posteriores como determinação de índice de peróxidos, dienos conjugados, ácidos graxos livres dentre outras (GUSSO et al., 2012; BRUM, 2004).

Os métodos de Folch et al. (1957), Bligh e Dyer (1959) e Hara e Radin (1978) são conhecidos como métodos de extração a frio. Desde o surgimento destes métodos, diversas pesquisas transcorreram, a fim de, preservar a qualidade da amostra (fração lipídica), manter o rendimento da extração a níveis satisfatórios e, formular solventes menos tóxicos (BRUM, 2009). O método de Hara e Radin (1978), baseado numa mistura de hexano:isopropanol:água (alcano:álcool:água), representa um sistema de solventes com menor grau de toxidez, menor custo e

menos extração de substâncias não lipídicas, quando comparada ao método de Bligh e Dyer (1957) (clorofórmio:metanol:água).

Para que os AG possam ser analisados por CG, eles devem ser convertidos em ésteres metílicos de ácidos graxos (EMAG). Os processos de metilação mais utilizados podem envolver uma catálise ácida ou uma catálise alcalina. Segundo a AOAC (Association of Official Analytical Chemistry) (2000), recomenda-se hidrólise alcalina para análise de AG no leite. Os métodos de catálise alcalina, empregando como agentes transesterificantes o metóxido de sódio (NaOCH_3) ou hidróxido de potássio (KOH) em metanol, é considerada o processo mais seguro pois não forma isomerizações. Por sua vez, a metilação por catálise ácida empregando trifluoreto de boro (BF_3), ácido clorídrico (HCl) ou ácido sulfúrico (H_2SO_4) favorece uma extensiva isomerização de dienos conjugados, podendo alterar sua configuração, transformando isômeros *cis*, *trans* ou *trans*, *cis* em isômeros *trans*, *trans*, e portanto, não são recomendados para a análise de lipídios do leite, bem como detecção de isômeros de CLA (CRISTIE; SÉBÉDIO; JUANÉDA, 2001; KRAMER, et al., 1997; YURAWECZ et al., 1994;).

A quantificação dos EMAG em alimentos é baseada no método de normalização de área, onde os resultados são expressos em porcentagem relativa de área do AG analisado em relação a área total de todos os AG e, a identificação no tempo de retenção (RODRIGUES, 2015; VISENTAINER, 2012). No entanto, organizações internacionais de excelência em química analítica como AOAC, AOCS (*American Oil Chemists' Society*), ISO (*International Organization for Standardization*) também preconizam a determinação quantitativa dos AG por CG empregando metodologia com adição de padrão interno (PI). O PI é um composto de natureza química semelhante ao composto que será determinado e é adicionado à amostra, sendo que o cálculo da composição dos analitos de interesse é feito em relação à área e massa deste componente. Na análise de AG são utilizados padrões de EMAG com número ímpar de carbono, uma vez que muitos destes não são encontrados na gordura dos alimentos (AUED-PIMENTEL et al., 2005).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 CEPAS BACTERIANAS E CONDIÇÕES DE CRESCIMENTO

Foram utilizadas inicialmente 35 cepas de BAL (QUADRO 3) previamente isoladas de matrizes alimentares e identificadas molecularmente através do sequenciamento do gene 16S rRNA, provenientes da coleção de culturas do laboratório de Microbiologia de Alimentos do Departamento de Ciências dos Alimentos da UNIPR (Parma - Itália), gentilmente cedidas pelo grupo de pesquisa do Prof. Erasmo Neviani.

Quadro 3. Cepas inicialmente testadas para identificação da habilidade em produzir CLA a partir de AL em leite de ovelha fermentado

(continua)

Espécie	Cepa	Origem
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> ssp. <i>bulgaricus</i>	2214	Queijo Grana Padano
	2259	Queijo Grana Padano
	2260	Queijo Grana Padano
	2230	Queijo Grana Padano
	1865	Desconhecida
	Lb260	Desconhecida
	Lb 261	Desconhecida
	Lb 263	Desconhecida
	Lb 264	Desconhecida
	Lb 265	Desconhecida
	Lb 308	Desconhecida
	Lb 309	Desconhecida
	Lb 313	Desconhecida
<i>Streptococcus thermophilus</i>	1688	Cultivo iniciador de Soro de Queijo Parmigiano Reggiano
	1689	Cultivo iniciador de Soro de Queijo Parmigiano Reggiano
	St 360	Cultivo iniciador do Leite de Queijo Valtellina Casera
	St 362	Cultivo iniciador do Leite de Queijo Valtellina Casera
	St 356	Cultivo iniciador do Leite de Queijo Valtellina Casera

Quadro 3. Cepas inicialmente testadas para identificação da habilidade em produzir CLA a partir de AL em leite de ovelha fermentado (conclusão)

Espécie	Cepa	Origem
<i>Streptococcus thermophilus</i>	St 393	Cultivo iniciador do Leite de Queijo Gorgonzola
	St 410	Cultivo iniciador de Soro de Queijo Provolone
	St 383	Queijo Provolone
	St 233	Cultivo iniciador de Soro de Queijo Grana Padano
	St 234	Cultivo iniciador de Soro de Queijo Grana Padano
	St 451	Cultivo iniciador de Soro de Queijo Pecorino Toscano
	St 257	Queijo Pecorino Toscano
	St 258	Queijo Pecorino Toscano
	St 508	Queijo Pecorino Toscano
	St 509	Queijo Pecorino Toscano
	St 357	Desconhecida
	St 361	Desconhecida
	St 363	Desconhecida
	St 366	Desconhecida
	St 387	Desconhecida
	St 388	Desconhecida
	St 390	Desconhecida

Fonte: A autora

Todas as cepas empregadas são consideradas potenciais cultivos iniciadores para fermentação láctea. As cepas de *Lactobacillus* foram inoculadas em caldo MRS (Merck, Darmstadt, Alemanha) e os *Streptococcus* em caldo M17 (HiMedia, Mumbai, Índia) e incubadas a 37 e 42 °C respectivamente, sob condições aeróbicas, durante 48 h.

Para a conservação das cepas, uma solução *stock* foi preparada com 0,5 mL de solução de glicerol (1:1 v/v) sobre 1 mL de suspensão bacteriana e mantida a -80 °C. A seleção inicial

teve como objetivo determinar a capacidade das cepas em produzir CLA a partir de AL em leite de ovelha suplementado.

3.2 TESTE DA PRODUÇÃO DE CLA PELAS CEPAS

Dez litros de um único lote de leite *in natura*, proveniente de ovelhas cruza Lacaune×Texel com peso vivo médio de 60 kg foram fornecidos gentilmente pela Fazenda Pinheiro Seco (Bom Retiro, SC, Brasil). O leite foi pasteurizado a 82 °C por 15 min, seguido de acondicionamento em garrafas de 500 mL previamente sanitizadas e resfriado imediatamente a 4,0 °C em banho de gelo. As alíquotas de leite foram mantidas congeladas até a utilização.

O substrato oleoso de AL foi preparado como solução *stock*, de acordo com Van Nieuwenhove et al. (2007). A solução foi preparada com uma concentração de 30 mg/mL de AL 99% puro (Neon, São Paulo, Brasil) em 40 mL de leite de ovelha com adição de 1% (v/v) de Tween 80 (Synth, Diadema, Brasil) para melhor solubilização. As cepas de *Lactobacillus* e *Streptococcus* foram reativadas *overnight* nas mesmas condições descritas acima para a revitalização. Sucessivamente, as células foram coletadas por centrifugação (4000 × g, 10 min) e ressuspensas em água peptonada 0,1% (p/v) até uma densidade óptica (DO) de 0,1 a 600 nm (espectrofotômetro modelo SP-2000 UV - Spectrum, Shangai, China). Cada cepa foi inoculada em leite de ovelha pasteurizado suplementado com 500 µg/mL de AL, 1% (p/v) de glicose, 5% (p/v) de leite em pó desnatado e incubada a 37 ou 42 °C até pH 4,65. Os leites fermentados foram mantidos a -20 °C até a realização da análise de AG.

3.3 ANÁLISE DE ÁCIDOS GRAXOS

As análises do perfil de AG das amostras de leite fermentado foram executadas em parceria com o Grupo de Química Analítica e Quimiometria (GQAQ) da Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF). A extração lipídica ocorreu conforme metodologia descrita por Hara e Radin (1978). À porção da amostra de leite previamente pesada adicionou-se uma solução HIP (hexano:isopropanol, 3:2). A mistura foi homogeneizada e posteriormente filtrada. O filtrado foi acrescido de uma solução de Na₂SO₄ e o sobrenadante transferido para

tubos contendo Na_2SO_4 anidro, para absorção de possível residual de água. O solvente foi evaporado com fluxo de nitrogênio até que permanecesse apenas a fração lipídica no tubo.

Os EMAG foram obtidos por catálise básica, em temperatura ambiente, de acordo com a metodologia proposta por Christie (1982). Adicionou-se à porção lipídica previamente pesada os solventes orgânicos hexano e metil acetato. Após homogeneização, acrescentou-se a solução de metilação (metóxido de sódio em metanol) e em seguida a solução de terminação contendo ácido oxálico e dietil éster. Posteriormente as fases foram separadas por centrifugação ($3200 \times g$, 5 min) em centrífuga modelo DT2-4000 (Daiki, Tóquio, Japão) e o sobrenadante transferido para microtubos mantidos sob temperatura de -20°C até o momento da análise.

O perfil de AG foi obtido por CG. As análises ocorreram em CG modelo GC 2010-Plus (Shimadzu, Kyoto, Japão), equipado com detector DIC, injetor automático (modelo AOC-1-20) e coluna capilar de sílica fundida (CP-SIL 88, $100\text{ m} \times 0.25\text{ mm} \times 0,2\text{ }\mu\text{m}$, Agilent Technologies, Palo Alto, USA). O volume de injeção foi de $1,0\text{ }\mu\text{L}$ modo *split* com taxa de fluxo de 1:50. As condições cromatográficas foram as mesmas descritas por Cruz-Hernandez et al. (2007). A temperatura para ambos injetor e detector foi fixada em 250°C . A temperatura do forno foi inicialmente programada em 45°C e mantida por 4 min, com aumento de $13^\circ\text{C}/\text{min}$ até 175°C e mantida por 27 min, com aumento de $4^\circ\text{C}/\text{min}$ até 215°C e mantida por 35 min. O gás de arraste utilizado foi o hidrogênio com razão de fluxo de $1,5\text{ mL}/\text{min}$ e pressão de $140,3\text{ kPa}$. Os compostos foram identificados por comparação do tempo de retenção relativo ao padrão Supelco 37 Component FAME Mix (Sigma Aldrich, São Paulo, Brasil) composto por uma mistura de 37 EMAG.

O isômero de CLA C18:2 *cis*-9; *trans*-11 foi determinado por normalização da área e expresso em mg/mL de leite fermentado. Como o leite foi utilizado sendo o meio de fermentação, o perfil de AG do leite foi quantificado e a produção de CLA pelas BAL foi calculada através da subtração do CLA naturalmente presente no leite conforme realizado por Van-Nieuwenhove et al. (2007). O percentual de aumento foi calculado de acordo com a equação 1. Dentre as cepas que mostraram maior habilidade para produzir CLA, apenas uma de cada gênero foram selecionadas para o experimento seguinte.

Equação 1:

$$\% \text{ de aumento de CLA} = (\text{MA}_{\text{CLA}} / \text{ML}_{\text{CLA}} \times 100) - 100$$

Legenda: MA_{CLA} = mg de CLA presente na amostra; ML_{CLA} = mg de CLA naturalmente presente no leite de ovelha.

3.4 CRESIMENTO EM MEIO COM AL

Para avaliar o potencial inibitório e habilidade das bactérias em crescer na presença de AL, 200 μL de cada cultura reativada *overnight* foi inoculado em caldo MRS e M17. Os meios foram suplementados com diferentes concentrações de AL (0, 250, 500, 1000, 1500 e 2000 $\mu\text{g/mL}$) e incubados durante 12 h a 37 ou 42 °C (conforme cada gênero) sob condições aeróbicas. O crescimento das cepas foi determinado por espectrofotometria em DO à 600 nm.

3.5 PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL E ANÁLISE ESTATÍSTICA

A fim de produzir um iogurte rico em CLA, foi empregado um delineamento fatorial fracionado para avaliação do efeito de diferentes condições de processamento sobre a produção de CLA pelas cepas, inicialmente selecionadas, em fermentação proto-cooperativa. O delineamento foi composto por quatro fatores em dois níveis (-1 e +1) e três repetições no ponto central (nível 0).

As cepas *St. thermophilus* St 360 e *Lb. bulgaricus* 2230 foram ensaiadas através de 11 experimentos, conforme otimização dos parâmetros (TABELA 6), para investigar o efeito de quatro variáveis independentes; o teor de glicose (X_1), a concentração de leite de ovelha em pó (X_2), a concentração de AL (X_3) e a proporção dos inóculos (X_4). A Tabela 7 apresenta o planejamento experimental com os valores reais correspondentes aos níveis codificados para cada fator avaliado.

Tabela 6. Matriz experimental proposta pelo delineamento fatorial fracionado para testar a influência das variáveis independentes

Tratamentos	Variáveis Codificadas			
	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄
1	-1	-1	-1	-1
2	1	-1	-1	1
3	-1	1	-1	1
4	1	1	-1	-1
5	-1	-1	1	1
6	1	-1	1	-1
7	-1	1	1	-1
8	1	1	1	1
9	0	0	0	0
10	0	0	0	0
11	0	0	0	0

Fonte: A autora

Tabela 7. Níveis codificados e valores reais para o delineamento fatorial

Fatores	Níveis		
	-1	0	1
Glicose (g/L) (X ₁)	10	20	30
Leite de ovelha em pó (g/L) (X ₂)	10	20	30
AL (g/L) (X ₃)	0,1	0,5	0,9
Proporção dos inóculos (St:Lb) (X ₄)	1:2	1:1	2:1

Fonte: A autora

Os dados experimentais foram ajustados ao modelo polinomial quadrático (Equação 2).

Equação (2):

$$Y = A_0 + \sum_{i=1}^n A_i X_i + \sum_{i=1}^n \sum_{j=i+1}^n A_{ij} X_i X_j$$

Legenda: **Y** = variável dependente; **A0** = coeficiente de regressão; **Ai** = linearidade; **Aii** = quadrado; **Aij** = coeficiente de interação; **Xi** e **Xj** = variáveis independentes.

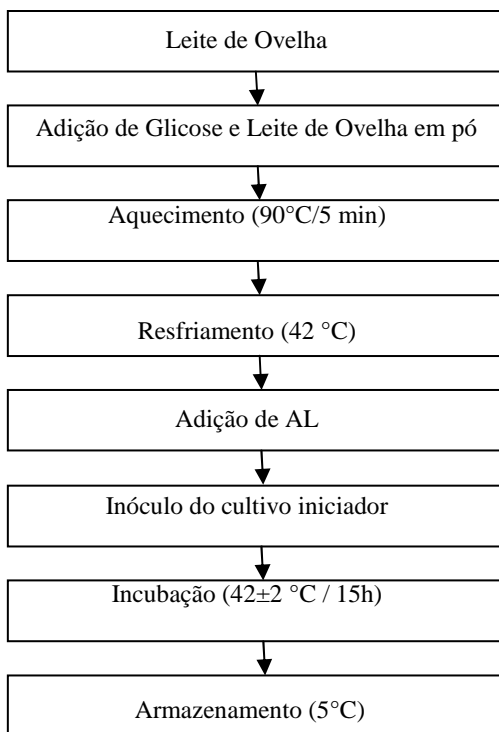
Os dados foram analisados usando o programa Statistica (versão 7,0) e o modelo foi avaliado usando um Teste-*F*. A

análise de variância (ANOVA), análise de regressão e a plotagem da função que correlaciona a produção de CLA com os fatores avaliados (teor de glicose, concentração de leite de ovelha em pó, concentração de AL e proporção dos inóculos).

3.5.1 Produção do iogurte

Os iogurtes foram desenvolvidos em parceria com o Grupo de Tecnologia de Látex Especiais da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM). O Quadro 4 representa o fluxograma de produção das formulações de iogurte.

Quadro 4. Fluxograma de produção das formulações de iogurte



Fonte: A autora

Para cada ensaio foram adicionados em um recipiente estéril, 0,5 L de leite de ovelha, glicose e leite de ovelha em pó, nas proporções estabelecidas pelo planejamento. Após a diluição as formulações foram aquecidas até 90 °C e mantidas por 5min em banho térmico. Em seguida foram resfriadas em banho de gelo até atingir 45 °C para posterior adição de AL e inóculo do cultivo iniciador nas proporções designadas pelo planejamento experimental. As formulações foram incubadas a 42±1 °C por 15 h. Após o período de fermentação, os iogurtes foram armazenados em temperatura de refrigeração (5±1 °C) para análises posteriores.

3.5.2 Identificação e quantificação do isômero de CLA

As análises de AG das formulações de iogurte foram desenvolvidas em parceria com o Núcleo Integrado de Desenvolvimento de Análises Laboratoriais (NIDAL) da UFSM. A extração lipídica, derivatização dos AG para EMAG e condições cromatográficas foram as mesmas descritas anteriormente. No entanto, a quantificação dos AG foi realizada pela adição de PI à gordura extraída das formulações de iogurte. Em um tubo de ensaio foi adicionado 1,0 mL de PI com concentração de 1 mg/mL de tricosanoato de metila (C23:0 Me) em iso-octano. Após a remoção completa do iso-octano com fluxo de N₂ gasoso, aproximadamente 25,0 mg de óleo foram adicionados aos tubos com o PI para posterior derivatização de AG para EMAG, conforme procedimento previamente descrito. Os cálculos foram realizados de acordo com a Equação 3 descrita por VISENTAINER (2012) e expressos em mg/g de lipídios totais.

Equação (3):

$$M_X = M_{PI} \times A_X \times F_{CT} / A_{PI} \times M_A \times F_{CFF}$$

Legenda: M_X = mg de AG por lipídios totais (g); M_{PI} = mg de PI; A_X = área do pico do EMAG; F_{CT} = fator de correção teórico; A_{PI} = área do pico do PI; M_A = g de lipídios da amostra; F_{CFF} = fator de conversão do EMAG para AG.

3.6 ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS

Para a caracterização físico-química dos iogurtes foram utilizados os seguintes métodos: umidade seguindo a instrução normativa (IN) brasileira nº 68 (Brasil, 2006) por secagem em estufa a 105 °C até peso constante; proteínas foram quantificadas através da determinação do teor de nitrogênio total pelo método de micro-Kjeldahl e convertido em proteína bruta pelo fator 6,38 (Brasil, 2006); cinzas foram determinadas por incineração em forno mufla a 550 °C de acordo com o método 945.46 AOAC (AOAC, 2007); acidez por titulação (0,1 N NaOH) usando fenolftaleína como indicador de acordo com o método 947.05 AOAC (AOAC, 2007); pH utilizando potenciômetro digital (DM-22, Digimed, São Paulo, Brasil).

Os dados foram expressos como média e desvio-padrão. A análise de variância (ANOVA) e teste de Tukey, baseado na amplitude total estudentizada (5% de significância), foram realizados para identificar diferenças significativas entre os resultados. Os dados foram analisados usando o *software* STATISTIC versão 7.0 (StatSoft Inc., Tulsa, OK, EUA).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 SELEÇÃO DAS BAL PRODUTORAS DE CLA

A primeira etapa deste trabalho consistiu-se em avaliar individualmente a habilidade de 35 cepas em produzir CLA a partir de AL em leite de ovelha suplementado. Das cepas testadas, 26 produziram, em diferentes níveis, um aumento no CLA total das amostras (TABELA 8). Jiang, Björck e Fondén (1998) encontraram resultados similares ao testar culturas lácteas (cultivo iniciador) num experimento *in vitro*.

Tabela 8. Aumento/decréscimo de CLA em leite de ovelha fermentado por cepas de *Lb. bulgaricus* e *St. thermophilus*

(continua)

Espécie	Cepa	CLA (mg/ml)	Aumento/Decréscimo (%)
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> ssp. <i>bulgaricus</i>	2214	0,82	25
	2259	0,61	-7
	2260	0,88	34
	2230	1,15	74
	1865	0,84	27
	Lb 260	0,88	34
	Lb 261	0,79	20
	Lb 263	1,03	56
	Lb 264	0,94	42
	Lb 265	0,71	7
	Lb 308	1,01	53
	Lb 309	0,90	36
	Lb 313	0,80	21
	1688	0,50	-24
<i>Streptococcus thermophilus</i>	1689	0,57	-14
	St 360	1,02	54
	St 362	0,95	44
	St 356	0,85	30
	St 393	0,84	28
	St 410	0,64	-3
	St 383	0,53	-20
	St 233	0,77	17

Tabela 8. Aumento/decréscimo de CLA em leite de ovelha fermentado por cepas de *Lb. bulgaricus* e *St. thermophilus* (conclusão)

Espécie	Cepa	CLA (mg/ml)	Aumento/Decréscimo (%)
<i>Streptococcus thermophilus</i>	St 234	0,92	39
	St 451	0,88	34
	St 257	0,38	-42
	St 258	0,57	-13
	St 508	0,60	-9
	St 509	0,53	-20
	St 357	0,89	35
	St 361	0,75	14
	St 363	0,64	0
	St 366	0,77	17
	St 387	0,71	8
	St 388	0,74	12
	St 390	0,82	24

Fonte: A autora

A depleção no CLA natural d leite após fermentação láctea por algumas linhagens bacterianas pode decorrer devido ao metabolismo lipolítico dos micro-organismos envolvidos ou, à temperatura de fermentação (GORISSEN et al., 2011). Segundo Hernandez-Mendoza et al. (2009) e Kishino et al. (2002) a capacidade de isomerização de AL em CLA por *Lactobacillus* submetidos à baixas temperaturas de fermentação, pode levar à mudanças na composição da membrana celular dessas cepas, ao passo que, o sistema bacteriano de controle térmico permite a regulação da fluidez da membrana celular pelo micro-organismo. Segundo Wang et al. (2005) diferentes cepas de *Lb. acidophilus* e *St. thermophilus* incubadas a baixas temperaturas, mostraram-se capazes de aumentar a incorporação de AGI pela membrana celular. Jenkins e Courtney (2003) descreveram uma preferência pela incorporação do CLA ao AL na membrana celular, o que pode justificar a depleção do CLA naturalmente presente no leite.

Segundo Hernandez-Mendoza et al. (2009), a intensidade da biohidrogenação pode diminuir se a integridade da membrana

celular for comprometida, pois a enzima responsável pela bioconversão do AL para CLA (linoleato isomerase) encontra-se ancorada à membrana celular. Desta forma, os autores sugerem que uma porção do AL presente no meio de crescimento isomerizado pela bactéria pode ser incorporado na membrana celular, enquanto que outra porção é liberada para o meio de crescimento.

Dentre as duas espécies testadas neste trabalho, os micro-organismos que demonstraram maior potencial para produção de CLA em leite de ovelha, foram *Lb. bulgaricus* 2230 e *St. thermophilus* St 360. O total de CLA quantificado foi 1,15 mg/mL (74% de aumento a partir do teor de CLA originalmente presente no leite) e 1,02 mg/mL (54% de aumento) respectivamente, conforme resultados apresentados na Tabela 12. Diversos autores reportaram a habilidade de diferentes espécies de BAL em produzir CLA (JIANG; BJORCK; FONDÉN, 1998; KIM; LIU, 2002; MACOUZET; LEE; ROBERT, 2009; RODRÍGUEZ-ALCALÁ et al., 2011; TÉRAN et al., 2015).

Lin, Lin e Lee (1999) estudaram a produção de CLA por cepas de *Lb. bulgaricus* e *St. thermophilus* e observaram um aumento nos níveis de CLA a partir de 1000 µg/mL de AL suplementado no meio de cultura, enriquecido com 12% (p/v) de leite desnatado em pó, incubados a 37 °C durante 24 h. Sob estas condições, as cepas de *Lb. bulgaricus* e *St. thermophilus* produziram 0,09 e 0,07 mg/mL de CLA, respectivamente. Van Nieuwenhove et al. (2007) obtiveram uma conversão de 30,3% ao inocular *St. thermophilus* em leite de búfala suplementado com 800 µg/mL de AL, enquanto neste mesmo estudo, as cepas de *Lb. bulgaricus* não se mostraram hábeis em produzir CLA a partir de AL.

4.2 AVALIAÇÃO DA TOLERÂNCIA E HABILIDADE DAS BAL EM CRESCER NA PRESENÇA DE AL

A fim de avaliar o potencial inibitório e habilidade das bactérias em crescer na presença de AL, as cepas de *Lb. bulgaricus* e *St. thermophilus* inicialmente selecionadas, cresceram em meios MRS e M17 na presença de diferentes concentrações de AL durante 12 h. A tolerância frente a diferentes concentrações de AL é cepa específica e reflete um estado metabólico e genético adaptativo (VAN NIEUWENHOVE

et al., 2007), além disso, a dose inibitória depende da biodisponibilidade do substrato oleoso na matriz (GORISSEN et al., 2012; TRIGUEROS; BARBER; SENDRA, 2015).

Ambas as cepas testadas não demonstraram aptidão metabólica para se desenvolver em uma concentração superior a 1000 µg/mL de AL suplementado no meio, sugerindo que a dose inibitória deste substrato para estas bactérias esteja entre 1000 e 1500 µg/mL. Kim e Liu (2002) avaliaram o efeito de diferentes concentrações de AL sobre o crescimento de *Lc. lactis*. O crescimento da BAL foi completamente inibido a uma dose superior a 500 µg/mL. Num estudo similar, o crescimento de *Bifidobacterium animalis* ssp. *lactis* INL2 foi avaliado em meio MRS-cisteína suplementado com 0, 200, 400, 500, 800 e 1000 µg/mL de AL. As concentrações mais altas de AL (800 e 1000 µg/mL) inibiram significativamente o crescimento desta espécie (TERÁN et al., 2015). De acordo com Lin, Lin e Lee (1999) este efeito inibidor pode ser atribuído à atividade antimicrobiana do AL livre disponível.

4.3 OTIMIZAÇÃO TECNOLÓGICA NA PRODUÇÃO DE CLA EM IOGURTE DE LEITE DE OVELHA

Esta etapa do trabalho teve como objetivo estudar os parâmetros envolvidos na produção de CLA a fim de, desenvolver e caracterizar um iogurte de leite de ovelha rico em CLA. A Tabela 9 demonstra a comparação entre os valores de resposta reais obtidos a partir dos dados experimentais e os valores de resposta previstos com base no modelo.

A análise de variância (ANOVA) (TABELA 10) mostra que o modelo polinomial quadrático foi significativo com um valor-*p* igual a 0,015 e suficiente para representar a relação entre a resposta e os parâmetros significativos. O valor-*F* (20,16) indica que o modelo é significativo a um intervalo de confiança de 95%.

Tabela 9. Comparação entre os valores de CLA (%) reais e previstos pelo modelo polinomial quadrático

Tratamento	CLA experimental	CLA previsto pelo modelo
1	36,82	36,16
2	26,92	26,26
3	1,74	1,07
4	11,34	10,67
5	4,32	3,66
6	30,23	29,57
7	42,86	42,19
8	38,66	37,99
9	19,60	23,45

Fonte: A autora

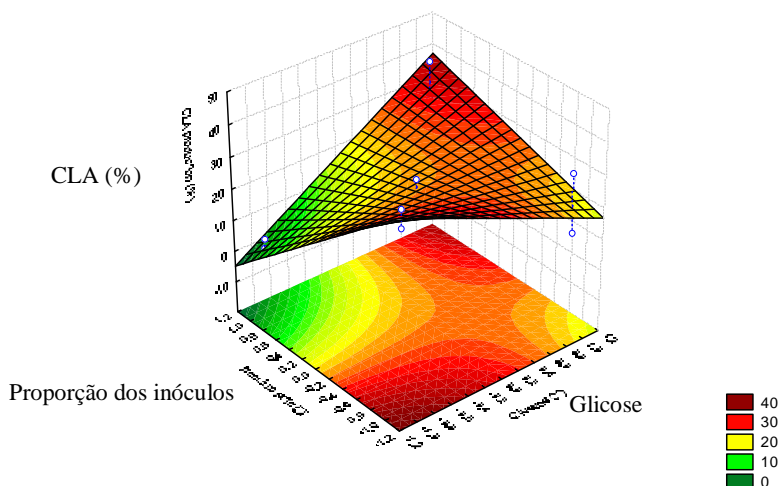
Tabela 10. Análise de variância (ANOVA) para o valor modelo polinomial fatorial ajustado para otimização na produção de CLA e equação do modelo

Modelo	$Y = 23,44 + 2,68 X_1 + 4,91 X_3 - 6,20 X_4 + 12,20 X_1 X_4$ $R^2 = 0,97$				
Fonte	SQ	GL	MQ	Valor-F	Valor-p
Modelo	1838,14	7	142,09	20,16	<0,015
Falta de ajuste	12,89	1	12,89	0,99	0,42
Erro puro	25,87	2	12,94		

Fonte: A autora

O valor do teste da falta de ajuste (0,99) maior do que 0,42, o qual não é relativamente significativo ao erro puro, indica que o ajuste do modelo é adequado para descrever os dados experimentais. O efeito das variáveis concentração de glicose, proporção dos inóculos e teor de AL, mostrou-se significativo ($p < 0,05$) para a produção de CLA pelas BAL. O efeito de interação de 2ª ordem entre as variáveis independentes não foi significativo exceto, sob concentração de glicose e proporção dos inóculos (FIGURA 6). O leite de ovelha em pó, usado na formulação como fonte protéica, não apresentou influência significativa para a produção de CLA.

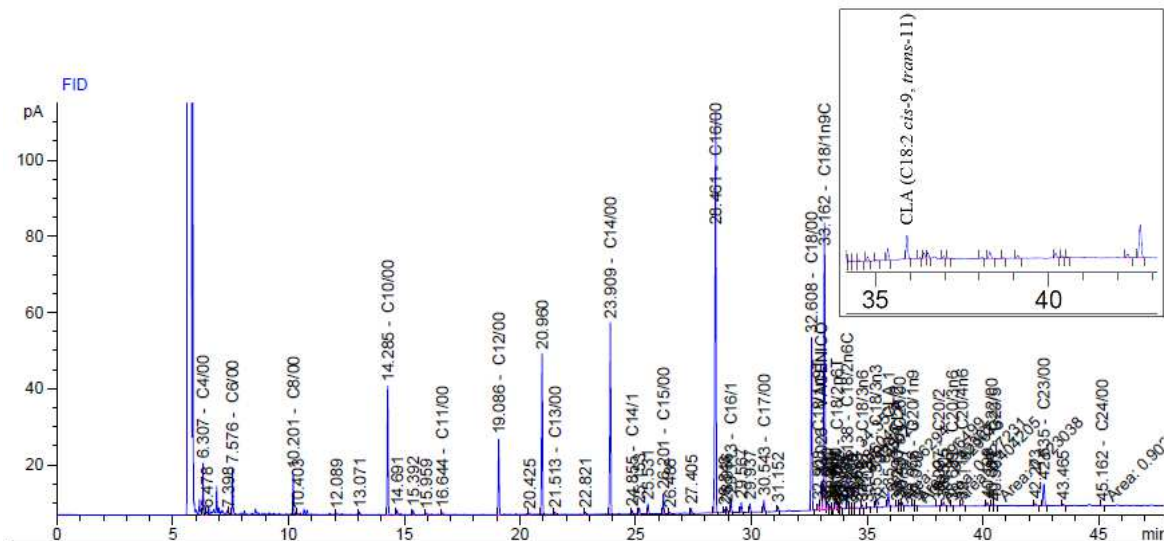
Figura 5. Superfície de resposta do efeito significativo ($p < 0.05$) da interação na síntese de CLA



Fonte: A autora

A melhor condição encontrada para a produção de CLA pelas cepas foi a do tratamento 7, obtida pela adição de 10 g/L (p/v) de glicose, 30 g/L (p/v) de leite de ovelha em pó, 0,90 g/L (p/v) de AL e proporção dos inóculos 1:2 (St:Lb) (v/v). O valor de CLA (isômero C18:2 *cis*-9, *trans*-11) quantificado no iogurte foi de 70,41 mg/g, equivalente a um aumento de 42,86% no teor de CLA a partir do leite de ovelha *in natura*. A Figura 7 demonstra o cromatograma de uma amostra do tratamento número 7 com destaque para o pico cromatográfico do isômero C18:2 *cis*-9, *trans*-11. Pesquisas anteriores (TABELA 5) têm aplicado diferentes modelos de sistemas para otimizar as condições de conversão de AL em CLA por diferentes espécies bacterianas com resultados variáveis de sucesso.

Figura 6. Cromatograma dos EMAG obtido a partir de iogurte de leite de ovelha. Ampliação demonstra o pico cromatográfico do isômero C18:2 *cis*-9, *trans*-11



Fonte: A autora

Estudos recentes testaram variáveis independentes na produção de leite fermentado, a fim de traçar a melhor condição para aumentar o teor de CLA no produto. O efeito das variáveis de processo foi investigado sobre a produção de CLA em iogurte probiótico contendo cepas de *Lb. acidophilus*, *B. bifidum* e *P. freudenreichii* por Khosravi-Darani, Reihani e Feili (2014). As variáveis incluíram adição de suplementos, condições de fermentação, além de viabilidade e densidade do inóculo. A maior quantidade de CLA (11,03 mg/g de lipídio) foi obtida através da adição de 4% (p/v) de soro de leite em pó, 4% (v/v) de óleo de semente de uva, inóculo de 0,8% (v/v) de cepas com 36 h de cultivo e temperatura de fermentação de 35 °C, durante 27 h de incubação. Os autores observaram um aumento de 40% de CLA nos iogurtes probióticos a partir de uma média inicial de 8,01 mg/g. Khosravi et al. (2015) avaliaram a habilidade de diferentes cepas de *Lactobacillus* em produzir CLA a partir de AL. *Lb. plantarum* apresentou o maior potencial produtor de CLA (95,25 µg/mL). Além disso, os autores aplicaram a metodologia de superfície de resposta para investigar o efeito de três variáveis independentes (concentrações de AL, teor de extrato de levedura e densidade do inóculo) sobre a formação de CLA. A condição ótima para propiciar a maior produção de CLA (240,69 µg/mL) foi obtida ao suplementar o meio com 3000 µg/mL de AL, 4 g/L de extrato de levedura e 4% (v/v) de densidade celular. Os resultados demonstraram ainda que a adição de extrato de levedura e glicose pode aumentar significativamente o crescimento celular e a produção de CLA pelas cepas estudadas.

Segundo Gorissen et al. (2011) a conversão de AL em CLA não depende somente da quantidade de AL adicionada ao meio, mas principalmente da biodisponibilidade do AG para a síntese pela bactéria. Ao aplicar cepas de *Bifidobacterium* e *Lb. sakei* capazes de produzir CLA *in vitro* como cultivo iniciador para fermentação láctea, Gorissen et al. (2012) não observaram aumento significativo no teor de CLA, mesmo ao empregar quantidade suficiente AL no leite. Este resultado pode estar de acordo com estudos prévios dos autores GORISSEN et al. (2011) ao sugerir que apesar de estar presente em quantidades favoráveis para estimular a conversão, o AL poderia não estar biodisponível para a utilização pelos micro-organismos.

Neste experimento, o AL foi utilizado como precursor para a produção de CLA pelas BAL. A maior produção de CLA (70,41 mg/g) obteve-se através da adição de 900 µg/mL de AL às amostras de iogurte. Xu, Boylston e Glatz (2004) testaram cepas de *Propionibacterium freudenreichii* ssp. *shermanii* através de um sistema modelo contendo óleo de soja hidrolisado para induzir a formação de CLA. O resultado obtido foi a produção de 1,45 mg do isômero C18:2 *cis*-9, *trans*-11 por g de lipídio em 24 h de fermentação. Lin, Lin e Lee (1999) avaliaram a capacidade de seis culturas lácticas em produzir CLA a partir de AL. Os resultados não apontaram diferenças significativas nos níveis de CLA das amostras que não continham adição do substrato AL, sugerindo que a suplementação de uma fonte de AL é indispensável para a conversão de CLA por fermentação láctea.

No presente estudo, cepas de *Lb. bulgaricus* e *St. thermophilus* foram inoculadas em co-cultura à diferentes formulações de iogurte de leite de ovelha, a fim de estudar a melhor condição destas BAL para produzirem CLA em proto-cooperação. Ao inocular as cepas na proporção de 1:2 (St:Lb), obteve-se um aumento significativo ($p < 0,05$) no percentual de CLA. A proporção clássica de cultivo iniciador específico para a produção de iogurte (1:1, St:Lb) demonstrou não ser efetiva para a síntese de CLA no produto. Na tecnologia de produção de leites fermentados, em específico de iogurte, se a proporção de 1:1 não for respeitada, a proporção é geralmente desequilibrada a favor dos cocos que vão conduzir as fases iniciais da fermentação. Em experimento semelhante, na expectativa de otimizar os parâmetros operacionais para a produção de CLA em leite desnatado, Ye et al. (2013) observaram maior rendimento ao inocular co-culturas de *Lb. acidophilus*:*St. thermophilus* e *Lb. acidophilus*:*Lb. plantarum* nas proporções de 1:1 e 1:4, respectivamente. Co-culturas de *Lb. acidophilus*:*Lb. plantarum* (1:4) produziram maior quantidade de CLA (110,70 µg/mL) comparado às co-culturas de *Lb. acidophilus*:*St. thermophilus* (1:1) (95,57 µg/mL).

A variável glicose teve um papel importante no aumento do teor de CLA nas amostras de iogurte analisadas. A adição da menor concentração de glicose (10 g/L) apresentou um efeito positivo na produção de CLA. A variação na síntese de CLA pode ser explicada pela função polinomial da concentração de

glicose e proporção das cepas. Duas hipóteses podem ser formuladas para explicar o fato da baixa concentração de glicose ter afetado positivamente a produção de CLA. A primeira delas sugere que uma alta disponibilidade de glicose no meio, poderia causar um *stress* metabólico devido à pressão osmótica gerada. A segunda está relacionada à presença de elevadas quantidades de AL, indicando que a partir de um determinado limite, possa ocorrer a ativação da resposta metabólica à intoxicação de AL convertendo este substrato a uma molécula menos tóxica ao seu crescimento celular. Será possível melhor compreensão dessas duas hipóteses em investigações futuras, a partir de estudos usando proteômica comparativa.

Kim e Liu (2002) demonstraram um aumento nos níveis de CLA ao inocular *Lactococcus lactis* em meio adicionado de 0,3% de glicose. Lin (2000) avaliou a capacidade de culturas de *Lb. bulgaricus* e *St. thermophilus* inoculadas individualmente em meio suplementado com 60 g/L de diferentes tipos de carboidratos (sacarose, lactose e frutose), em sintetizar o isômero C18:2 *cis*-9, *trans*-11. Todos os carboidratos nesta concentração inibiram a produção de CLA por *Lb. bulgaricus*. No entanto, a lactose exibiu menor propriedade inibitória sobre a produção de CLA por cepas de *St. thermophilus*.

4.4 ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS

Os resultados analíticos das características físico-químicas das amostras de iogurtes de leite de ovelha nos tratamentos estão apresentados na Tabela 11. Não houve diferenças significativas ($p>0,05$) entre o teor de umidade das amostras analisadas. Serafeimidou et al. (2013) encontraram valores similares (79,37%) ao estudar a composição de iogurtes de leite de ovelha, além disso não observaram alterações significativas ($p>0,05$) durante o tempo de armazenamento. Prandini et al. (2001) reportaram não haver correlação entre o teor de CLA e a umidade de iogurtes analisados em sua pesquisa.

Houve diferença significativa ($p>0,05$) no teor de cinzas (%) entre as amostras de iogurte. O maior percentual foi observado na formulação do tratamento 3 (1,08%), enquanto que o menor foi encontrado no tratamento 6 (0,89%). Bano et al. (2011) usaram concentrações diferentes de leite de cabra e de

ovelha para desenvolver um iogurte funcional. O teor de cinzas aumentou significativamente nas amostras contidas de maior percentual de leite de ovelha.

Tabela 11. Características físico-químicas dos tratamentos referentes às diferentes formulações dos iogurtes de leite ovelha produzidos

Tratamento	Umidade (%)	Cinzas (%)	Proteína (%)	pH	Acidez titulável (% ácido láctico)
1	81,79 ^a	1,02 ^{a,b}	5,96 ^{a,b}	4,34 ^{a,b}	1,64 ^{a,b,c}
2	75,38 ^a	1,00 ^{a,b,c}	5,72 ^{a,b}	4,33 ^{a,b}	1,59 ^{a,b}
3	76,28 ^a	1,08 ^a	6,25 ^{a,b}	4,28 ^{a,b}	1,58 ^a
4	77,01 ^a	1,03 ^{a,b}	6,11 ^{a,b}	4,58 ^{a,b}	1,35 ^d
5	81,27 ^a	0,92 ^{b,c}	5,70 ^a	4,64 ^b	1,75 ^{a,b,c}
6	77,93 ^a	0,89 ^c	5,06 ^a	4,16 ^a	1,76 ^{b,c}
7	79,96 ^a	0,99 ^{a,b,c}	6,84 ^b	4,26 ^{a,b}	1,64 ^{a,b,c}
8	76,95 ^a	1,06 ^a	6,15 ^{a,b}	4,47 ^{a,b}	1,60 ^{a,b,c}
9	79,73 ^a	1,02 ^a	5,90 ^{a,b}	4,31 ^{a,b}	1,77 ^c

Fonte: A autora

As BAL hidrolisam parcialmente as proteínas, aumentando assim a quantidade de aminoácidos livres nos produtos lácteos fermentados. Desta forma, as proteínas do iogurte são mais facilmente digeríveis do que as proteínas presentes no leite *in natura*, embora os teores de proteína entre ambos sejam semelhantes (HOSSAIN, 2015). No geral, não houve diferença significativa ($p > 0,05$) entre os experimentos, com exceção do tratamento 7 (6,84%) com os tratamentos 5 (5,70%) e 6 (5,06%). Katsiari, Voutsinas e Kondyli (2002) e Voutsinas et al. (1996) encontraram valores protéicos similares ao analisarem iogurtes de leite de ovelha. Baseado nos resultados de Khosravi-Darani, Reihani e Feili (2014), a adição de 4% de soro de leite em pó ao leite integral, contribuiu para aumentar os teores de CLA. Os autores sugerem que, as proteínas agem como doadoras de hidrogênio, nas primeiras etapas da biohidrogenação, facilitando a isomerização do AL e consequentemente a síntese de CLA. Kim e Liu (2002) também observaram um efeito positivo ao

empregar leite em pó desengordurado como fonte protéica para a formação de CLA.

Os resultados analíticos mostraram diferenças significativas ($p > 0,05$) entre os tratamentos 5 (4,64%) e 6 (4,16%) para os valores de pH. Balthazar et al. (2015) que produziram um iogurte de leite de ovelha com pH de 4,41. Os mesmos autores relataram resultados de acidez próximos aos encontrados neste estudo (0,94% ácido láctico).

Diferenças significativas ($p > 0,05$) na acidez titulável apareceram entre alguns tratamentos. O maior percentual de ácido láctico foi registrado no tratamento 9 (1,77), enquanto que o menor no tratamento 4 (1,35). *St. thermophilus* pode produzir aproximadamente 0,5% de ácido láctico, e o *Lb. bulgaricus*, de 0,6 a 0,8% (pH 4,2 - 4,5). Contudo, se o tempo de incubação for maior, o pH pode diminuir e o ácido láctico aumentar para até 2% (Jay, 2005). De acordo com Serafeimidou et al. (2012) o teor de ácido láctico não aparenta estar envolvido com a formação de CLA nos produtos lácteos.

4.5 COMPOSIÇÃO DE ÁCIDOS GRAXOS

A fim de determinar a influência do tempo de armazenamento sobre a composição de AG, especialmente a concentração de CLA dos iogurtes produzidos a partir dos diferentes tratamentos, o percentual de AG das diferentes amostras foram analisados no primeiro e décimo quarto dia após a fermentação, sob armazenamento a 5 °C (TABELA 12).

A composição de AG foi classificada em saturados (AGS), monoinsaturados (AGMI) e poliinsaturados (AGPI), de acordo com o grau de saturação. Além disso, as quantidades do isômero C18:2 *cis*-9, *trans*-11 também estão apresentadas, em ambos períodos analisados.

Tabela 12. Níveis de AG (% EMAG totais) e CLA (mg/g de lipídio) dos tratamentos no 1º e 14º dias após fermentação

Tratamento	AGS (%)		AGMI (%)		AGPI (%)		CLA (mg/g) (<i>cis</i> -9, <i>trans</i> -11)	
	1º dia	14º dia	1º dia	14º dia	1º dia	14º dia	1º dia	14º dia
1	71,70	71,30	25,10	24,55	3,17	4,15	67,43	55,22
2	72,77	71,37	23,80	24,40	3,43	4,24	62,55	48,42
3	72,20	71,48	23,82	24,40	4,00	4,15	50,14	50,42
4	72,54	71,07	23,53	24,67	3,93	4,25	54,87	48,20
5	73,47	71,80	22,78	23,94	3,75	4,28	51,41	48,26
6	72,02	71,21	23,76	24,60	4,21	4,20	64,18	55,17
7	72,15	71,26	23,70	23,61	4,13	4,26	70,41	47,95
8	72,56	71,20	23,51	24,54	3,92	4,25	68,34	47,02
9	72,16	71,15	23,81	24,60	4,03	4,25	58,94	49,31

Fonte: A autora

Legenda: AGS = ácidos graxos saturados; AGMI = ácidos graxos monoinsaturados; AGPI = ácidos graxos poliinsaturados

O teor de AGPI variou entre 3,17% e 4,26%. Serafeimidou et al. (2012) observaram menor valor de a AGPI (2,8%) em iogurte de leite ovelha, enquanto em outro estudo descrito por Serafeimidou et al. (2013) os autores encontraram quantidade equivalente de AGPI (4,5%) descritos neste trabalho.

Em geral, o percentual de CLA dos tratamentos analisados diminuiu durante os 14 dias de armazenamento refrigerado a 5 °C. Estas alterações podem ser atribuídas à atividade oxidante das culturas, o que levaria ao desarranjo do sistema de ligação dupla conjugada, provocando a redução de CLA no meio (SERAFEIMIDOU et al., 2013). Florence et al. (2012) sugeriram uma possível estratégia para aumentar a quantidade de CLA em leites fermentados sob armazenamento refrigerado co-inoculando bactérias probióticas e cultivo iniciador de iogurte. Os autores encontraram um aumento significativo no teor de CLA após 7 dias de armazenamento refrigerado a 4 °C, em leite fermentado com *Bifidobacterium animalis* ssp. *lactis* em co-cultura com *St. thermophilus* e *Lb. bulgaricus*. Em concordância com estes resultados, Xu, Boylston e Glatz (2005) selecionaram quatro bactérias consideradas probióticas e as inocularam individualmente ou em co-cultura com cultivo iniciador de iogurte para avaliar a formação de CLA em leite fermentado. A combinação da maioria das bactérias com as culturas de iogurte produziram maior quantidade de isômeros de CLA comparado àquelas inoculadas sozinhas, após os 14 dias de armazenamento. Desta forma, sugere-se que a incorporação de bactérias probióticas é uma forte aliada na manutenção dos níveis de CLA durante períodos de 14 dias sob refrigeração.

Em estudo similar, Serafeimidou et al. (2013) descreveu alterações na concentração de CLA de iogurtes produzidos com leite bovino e ovino após 14 dias de refrigeração a 5 °C. O armazenamento refrigerado resultou num decréscimo significativo de CLA nos iogurtes de leite de vaca, enquanto os iogurtes de leite de ovelha apresentaram tendência oposta, indicando contradição ao comparar com os resultados obtidos nesta pesquisa. Ainda há controvérsias em relação ao efeito do tempo de armazenamento sobre o teor de CLA de produtos lácteos (SERAFEIMIDOU, 2013).

Alguns autores têm sugerido que a acumulação de ácido láctico pode impactar negativamente sobre o teor de CLA (KIM; LIU, 2002; KHOSRAVI-DARANI et al., 2014). Neste trabalho, as cepas de *Lb. bulgaricus* e *St. thermophilus* em co-cultura propiciaram uma condição favorável à produção de ácidos pelo longo processo fermentativo (pós-acidificação), podendo explicar em partes os resultados obtidos de decréscimo em duas semanas. Além disso, uma alteração no perfil de AG pode levar a mudanças impactantes nas características físico-químicas dos produtos lácteos, já que um elevado teor de AGI pode aumentar do risco de oxidação e formação de *off-flavors* nestes produtos (COLOMB et al., 2006).

A Tabela 13 exhibe o perfil de AG de cada tratamento formulado para a produção dos iogurtes. Os resultados indicaram um padrão de oscilação interessante entre os isômeros C18:2 *cis*-9, *trans*-11 e C18:2 *trans*-10, *cis*-12. A quantidade de AL adicionada ao meio parece ter influenciado nesta proporção.

Os tratamentos suplementados com 0,1 g/L de AL (1-4), desfavoreceram a síntese do isômero C18:2 *trans*-10, *cis*-12, que correspondeu de 0-10% do total de CLA quantificado. Enquanto que os tratamentos suplementados com 0,90 g/L de AL (5-8) contribuíram para a produção deste isômero, que correspondeu de 22-25% do total de CLA quantificado. Porém, em todos os tratamentos o isômero C18:2 *cis*-9, *trans*-11 foi o majoritário. Além disso, foi observado que o fator em comum entre os dois tratamentos capazes de formar o isômero C18:2 *trans*-10, *cis*-12 sob baixas concentrações de AL, foi a proporção dos inóculos de 2:1 entre *St. thermophilus* e *Lb. bulgaricus*. Dessa forma, a produção individual destes dois isômeros é atribuída à concentração de AL suplementado ao meio e cepa dependente.

Dentre os AG envolvidos na biohidrogenação do AL, uma observação meramente empírica, apontou para uma proporção inversa entre os teores de AL e o AV, o que pode ser explicado pelo caráter reversível das rotas metabólicas (processos de isomerização e hidrogenação) (FIGURA 3). Porém, esta questão foi pouco explorada pelos pesquisadores e ainda carece de maiores esclarecimentos.

Tabela 13. Perfil de AG dos iogurtes de leite ovelha produzidos (mg/g de lipídio)

(continua)

Ácido Graxo	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	T9
C4	332,04	266,42	204,78	232,20	157,41	207,62	240,71	261,20	179,80
C6	296,69	188,52	79,15	189,67	149,55	176,32	217,74	187,48	149,01
C8	180,74	160,75	116,01	142,63	138,00	162,39	187,30	175,68	129,26
C10	517,49	475,38	344,96	424,04	408,90	487,29	546,58	528,23	384,63
C11	76,62	6,96	5,41	6,54	6,33	7,52	8,49	8,39	6,01
C12	315,53	228,23	204,02	250,42	244,58	292,54	323,69	312,26	228,31
C13	8,97	7,81	5,78	7,04	6,91	8,15	9,32	8,80	6,33
C14	0,00	730,36	519,65	638,00	641,55	767,29	831,57	799,98	589,75
C14:1n5	17,52	13,51	9,01	10,87	9,69	12,43	13,87	12,43	9,55
C15	84,25	75,71	54,19	66,39	66,32	80,06	86,54	83,48	61,74
C15:1n5	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	5,10	0,00	0,00	4,23
C16	1930,17	1707,31	1219,81	1492,41	1515,62	1810,03	1980,24	1874,09	1385,84
C16:1n7	58,57	53,31	39,26	45,37	4,16	55,11	58,33	54,44	43,11
C17	48,83	44,20	31,14	38,18	39,41	47,35	50,57	48,54	36,38

Tabela 13. Perfil de AG dos iogurtes de leite ovelha produzidos (mg/g de lipídio)

(continuação)

Ácido Graxo	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	T9
C17:1n7c	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
C18:0	753,54	681,96	480,03	587,04	628,44	740,41	795,15	744,75	557,10
C18:1n9t	35,71	32,44	21,94	28,81	24,31	34,40	34,30	36,08	27,27
C18:1	157,45	145,34	104,97	149,64	149,01	158,95	174,64	155,21	120,97
C18:1n9c	1348,73	1200,65	853,62	1051,22	1005,93	1254,72	1395,05	1326,23	970,32
C18:2n6t9t12	24,69	21,16	16,28	19,70	19,21	24,00	24,06	25,45	17,74
C18:2n6c	26,93	105,25	78,74	94,45	88,88	113,32	133,05	119,53	86,11
C18:3n6	0,00	0,00	5,97	0,00	25,12	15,18	18,76	17,89	12,06
C18:3n3	32,62	29,26	19,73	24,67	24,40	30,29	32,81	31,31	23,31
CLA-1 (C18:2 c-9, t-11)	67,43	62,55	50,15	54,87	51,41	64,18	70,41	68,34	58,94
CLA-2 (C18:2 t-10, c-12)	0,00	4,90	5,00	0,00	14,59	21,42	24,18	19,64	9,25
C20	15,21	13,62	9,59	10,89	12,56	15,11	16,04	14,90	12,10
C20:1n9c11	72,33	30,28	3,55	4,90	4,43	5,47	6,92	5,75	4,05
C20:2n6c	50,95	28,75	3,11	28,17	0,00	4,68	28,93	5,59	3,62

Tabela 13. Perfil de AG dos iogurtes de leite ovelha produzidos (mg/g de lipídio)

(conclusão)

Ácido Graxo	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	T9
C21	0,00	16,61	0,00	0,00	0,00	2,48	19,35	0,00	1,64
C20:3n6c	0,00	20,13	5,09	15,76	0,00	10,84	27,24	0,00	12,16
C20:4n6	8,48	7,25	5,88	7,21	6,33	7,94	9,36	8,97	6,31
C20:3n3c	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
C22	74,23	7,12	3,77	4,92	4,79	6,31	6,11	5,48	4,64
C20:5n3	7,36	5,68	0,91	30,60	3,25	3,60	31,66	33,65	13,20
C24	57,90	22,77	16,94	30,63	26,27	16,57	37,28	27,60	10,32

Fonte: A autora

5 CONCLUSÃO

O potencial de algumas cepas de BAL em produzir CLA a partir de AL. Doze das 13 cepas de *Lb. bulgaricus* testadas exibiram capacidade de produzir CLA (isômero C18:2 *cis*-9, *trans*-11). As cepas bacterianas classificadas como produtoras demonstraram um potencial de aumento do teor de CLA, de 7 a 74% a partir do leite cru. Quanto às 22 cepas de *St. thermophilus* estudadas, 13 demonstraram habilidade em aumentar o teor de CLA (de 8 a 54%). Desta forma, quando inoculadas em co-cultura, *Lb. bulgaricus* 2230 e *St. thermophilus* St. 360 mostraram potente atividade de síntese deste isômero, aumentando consideravelmente seus níveis em iogurte de leite de ovelha. As condições ótimas para formulação de iogurte, a fim de obter maior produção de CLA (70,41 mg/g) pelas cepas em co-cultura foi adicionando 10 g/L (p/v) de glicose; 30 g/L (p/v) de leite de ovelha em pó; 0,90 g/L (p/v) de AL e proporção das cepas de 1:2 (St:Lb) (v/v). Entretanto, após 14 dias de armazenamento refrigerado (5 °C), os iogurtes condicionados às diferentes formulações, sofreram um decréscimo de 6,13 a 31,89% de CLA (isômero C18: 2 *cis*-9, *trans*-11) a partir do primeiro dia de fermentação. A fim de conferir benefícios à saúde, a dose diária de CLA recomendada a uma pessoa de 70 kg de peso corporal, é de 3 g. Para alcançar esta recomendação, o consumo de cerca de 4 porções de 250 mL por dia do iogurte produzido neste trabalho, seria suficiente. No entanto, uma investigação mais aprofundada sobre a ingestão de CLA faz-se necessária, considerando o fato de que existem outras fontes de CLA na dieta humana. Embora os isômeros de CLA ainda não constem na “Lista de alegações de propriedades funcionais aprovadas” pela legislação brasileira (ANVISA), sua inclusão poderá acontecer num futuro próximo. Diante desta expectativa os resultados obtidos pelo modelo permitirão a transferência de tecnologia através da combinação dos fatores de produção para a otimização no desenvolvimento de iogurte rico em CLA, oferecendo à indústria alimentícia a oportunidade de lançar um novo produto lácteo funcional no mercado. Em uma perspectiva futura, a caracterização das cepas selecionadas neste trabalho deverá ser avaliada em profundidade, a fim de explorar a segurança das cepas e as potenciais propriedades funcionais que

podem ser aplicadas aos produtos, visando a promoção da saúde dos consumidores.

REFERÊNCIAS

AHMADOVA, A.; TODOROV, S. D.; CHOISET, Y.; RABESONA, H.; MIRHADI ZADI, T.; KULIYEV, A.; HAERTLÉ, T. Evaluation of antimicrobial activity, probiotic properties and safety of wild strain *Enterococcus faecium* AQ71 isolated from Azerbaijani Motal cheese. **Food Control**, v. 30, n. 2, p. 631-641, 2013.

AKOH, C. C.; MIN, D. B. **Food lipids: chemistry, nutrition, and biotechnology**. 3rd ed. New York: Boca Raton, 2008. 928p.

ALHAJ, O.A.; KANEKANIAN, A. Milk-derived Bioactive Components from Fermentation. In: KANEKANIAN, A. (Ed.). **Milk and Dairy Products as Functional Foods**. UK: Wiley & Sons, Ltd: Chichester, 2014. p. 237 – 288.

AOCS. **Official methods and recommended practices of the American Oil Chemists' Society**. 4th ed. (A.O.C.S. Official Method Ce 1-62: Fatty acid composition by gas chromatography); Champaign, USA; 1995.

AOCS. **American Oil Chemists' Society. Official methods and recommended practices of the American Oil Chemists' Society**. 4th ed. (A.O.C.S. Official, Method Ce 1f-96: Determination of *cis*- and *trans*-fatty acids in hydrogenated and refined oils and fats by capillary GLC); Champaign, USA; 1997.

AOAC, Official Method 945.46. **Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists**, 8th ed., revision 2. Gaithersburg, Maryland: AOAC International, 2007.

AOAC Official Method 947.05. **Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists**, 8th ed., revision 2. Gaithersburg, Maryland: AOAC International, 2007.

AOAC **Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists**, 17th ed., Gaithersburg, Maryland: AOAC International, 2000.

AUED-PIMENTEL, S.; CARUSO, M. S. F.; KUMAGAI, E. E.; RUVIERI, V.; ZENEBON, O. Ácidos graxos saturados em produtos alimentícios: comparação de procedimentos na análise por cromatografia gasosa. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 64, n. 2, p. 167-172, 2005.

BALTHAZAR, C. F.; GAZE, L. V.; AZEVEDO DA SILVA, H. L.; PEREIRA, C. S.; FRANCO, R. M.; CONTE-JÚNIOR, C. A.; FREITAS, M. Q.; OLIVEIRA SILVA, A. C. Sensory evaluation of ovine Milk yoghurt with inulin addition. **International Journal of Dairy Technology**, v. 68, n. 2, p. 281-290, 2015.

BANO, P.; ABDULLAH, M.; NADEEM, M.; BABAR, M. E.; KHAN, G. A. Preparation of functional yoghurt from sheep and goat milk blends. **Pakistan Journal of Agricultural Sciences**, v. 48, n. 3, p. 211-215, 2011.

BARBOSA N. R.; GAMA M. A. S.; LOPES F. C. F.; DEFILLIPO P. P.; MURY F. B.; TREVISANI R.; OLIVEIRA D. E.; GATTAZ W. F. Activity of phospholipase A2 (PLA2) subtypes in rat brain is altered by feeding conjugated linoleic acid (CLA) and linseed oil. **Alzheimer's & Dementia**, v. 5, n. 4, p. 326, 2009.

BASSAGANYA-RIERA, J.; HONTECILLAS, R.; HORNE, W. T.; SANDRIDGE, M.; HERFARTH, H. H.; BLOOMFELD, R.; ISAACS, K. L. Conjugated linoleic acid modulates immune responses in patients with mild to moderately active Crohn's disease. **Clinical Nutrition**, v. 31, p. 721-727, 2012.

BASSAGANYA-RIERA, J.; HONTECILLAS, R. Dietary CLA and n-3 PUFA in inflammatory bowel disease. **Current Opinion in Clinical Nutrition & Metabolic Care**, v. 13, p. 569-573, 2010.

BELURY, M. A. Dietary Conjugated Linoleic Acid in Health: Physiological Effects and Mechanisms of Action 1. **Annual Review of Nutrition**. 22, n. 1, p.505-531, 2002.

- BENCINI, R.; PULINA, G. The quality of sheep milk: a review. **Animal Production Science**, v. 37, n. 4, p. 485-504, 1997.
- BENJAMIN, S.; SPENER, F. Conjugated linoleic acids as functional food: an insight into their health benefits. **Nutrition & Metabolism**, v. 6, n. 1, p.36, 2009.
- BHATTACHARYA, A.; BANU, J.; RAHMAN, M.; CAUSEY, J.; FERNANDES, G. Biological effects of conjugated linoleic acids in health and disease. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 17, p. 789-810, 2006.
- BLANKSON, H.; STAKKESTAD, J. A.; FAGERTUN, H.; THOM, E.; WADSTEIN, J.; GUDMUNDSEN, O. Conjugated linoleic acid reduces body fat mass in overweight and obese humans. **Journal of Nutrition**, n.130, p. 2943-2948, 2000.
- BLIGH, E. G.; DYER, W. J. A rapid method of total lipid extraction and purification. **Canadian journal of biochemistry and physiology**, v.37, n. 8, p. 911-917, 1959.
- BLOCK, J. M.; BARRERA-ARELLANO, D. **Temas Selectos en Aceites y Grasas: Procesamiento**. 1 ed. São Paulo: Blucher, 2009. 475 p.
- BOTTAZZI, V.; AGOSTONI, C.; BALLARINI, G.; BATTISTOTTI, B.; DE NONI, I.; LANZOLA, E.; VERGANI, C. / **Latti Fermentati**: Aspetti biochimici, tecnologici, probiotici e nutrizionali. Milano: Istituto Danone, 1998. 156 p.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). Instrução Normativa nº 46 de 23 de outubro de 2007. **Diário Oficial da União**, Brasília, 23 de outubro de 2007.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). Instrução Normativa nº 68 de 12 de dezembro de 2006. Estabelece métodos analíticos físico-químicos oficiais para leite e produtos lácteos. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, p. 8, Seção 1, 14 de dezembro de 2006.

BRASIL. Resolução RDC nº 5, de 13 de Novembro de 2000. A Secretaria de Defesa Agropecuária, Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal – DIPOA – determina a entrada em vigor dos “padrões de identidade e qualidade de leites fermentados”. **Diário Oficial da União**, Brasília, 02 de Janeiro de 2001. Seção I, p. 19-22. [Republicado nesta data por ter saído com incorreção no original, DOU de 27/11/2000. Seção I, p. 9-12].

BRASIL. Resolução RDC nº 16, de 30 de abril de 1999. Aprova o Regulamento Técnico de Procedimentos para Registro de Alimentos e ou Novos Ingredientes. **Diário Oficial da União**, Brasília, 03 de maio de 1999b.

BRASIL. Resolução RDC nº 17, de 30 de abril de 1999. Aprova o Regulamento Técnico que Estabelece as Diretrizes Básicas para Avaliação de Risco e Segurança dos Alimentos. **Diário Oficial da União**, Brasília, 03 de maio de 1999c.

BRASIL. Resolução RDC nº 18, de 30 de abril de 1999. Aprova o Regulamento Técnico que Estabelece as Diretrizes Básicas para Análise e Comprovação de Propriedades Funcionais e ou de Saúde Alegadas em Rotulagem de Alimentos. **Diário Oficial da União**, Brasília, 03 de maio de 1999a.

BRASIL. Resolução RDC nº 19, de 30 de abril de 1999. Aprova o Regulamento Técnico de Procedimentos para Registro de Alimento com Alegação de Propriedades Funcionais e ou de Saúde em sua Rotulagem. **Diário Oficial da União**, Brasília, 3 de maio de 1999d.

BRASIL. Informe Técnico nº 23, de 17 de abril de 2007. Esclarecimentos sobre as avaliações de segurança do ácido linoléico conjugado (CLA). Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Diário Oficial da União**, Brasília, 23, de 17 de abril de 2007. [última atualização em fevereiro de 2013].

BRITO, M. A.; GONZÁLEZ, F. D.; RIBEIRO, L. A.; CAMPOS, R.; LACERDA, L.; BARBOSA, P. R.; BERGMANN, G. Composição do sangue e do leite em ovinos leiteiros do sul do Brasil: Variações na gestação e na lactação. **Ciência Rural**, v. 36,

n. 3, p. 942-948, 2006 *apud* MONTEIRO, V. F.; LEAL, N. S.; MARQUES, R. O.; FERNANDES, S.; SIQUEIRA, E. R. D. Caracterização e avaliação sensorial de queijo minas frescal de leite de ovelhas suplementadas com óleo de linhaça. **Synergismus Scyentifica UTFPR**, v. 8, n. 2, 2013.

BROADBENT, J. R.; STEELE, J. L. Cheese flavor and the genomics of lactic acid bacteria. **American Society for Microbiology News**, v. 71, n. 3, p. 121-128, 2005.

BRUM, A. A. S. **Métodos de extração e qualidade da fração lipídica**. 2004. 66 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba. 2004.

BRUM, A. A. S.; DE ARRUDA, L. F.; REGITANO-D´ARCE, M. A. B. Métodos de extração e qualidade da fração lipídica de matérias-primas de origem vegetal e animal. **Química Nova**, v. 32, n. 4, p. 849-854, 2009.

BYLUND, G. **Dairy processing handbook**. 2 ed. Lund, Sweden: Tetra Pak Processing Systems AB, 2003. 452 p.

CENTENO, J. A.; TOMILLO, F. J.; FERNÁNDEZ-GARCÍA, E.; GAYA, P.; NÚÑEZ, M. Effect of wild strains of *Lactococcus lactis* on the volatile profile and the sensory characteristics of ewes' raw milk cheese. **Journal of Dairy Science**, v. 85, n. 12, p. 3164-3172, 2002.

CHRISTIE, W. W. A simple procedure for rapid transmethylation of glycerolipids and cholesterol esters. **Journal of Lipid Research**, v. 23, p. 1072, 1982.

CHRISTIE, W. W.; SÉBÉDIO, J. L.; JUANÉDA, P. A practical guide to the analysis of conjugated linoleic acid (CLA). **Inform**, v. 12, p. 147-152, 2001.

CLAEYS, W. L., VERRAES, C., CARDOEN, S., DE BLOCK, J., HUYGHEBAERT, A., RAES, K., DEWETTINCK, K.; HERMAN, L. Consumption of raw or heated milk from different

species: An evaluation of the nutritional and potential health benefits. **Food Control**, v. 42, p.188-201, 2014.

CHEN, S. C.; LIN, Y. H.; HUANG, H. P.; HSU, W. L.; HOUNG, J. Y.; HUANG, C. K. Effect of conjugated linoleic acid supplementation on weight loss and body fat composition in a Chinese population. **Nutrition**, v. 28, p. 559-565, 2012.

CHERIGUENE, A.; CHOUGRANI, F.; BEKADA, A. M. A.; EL SODA, M.; BENSOLTANE, A. Enumeration and identification of lactic microflora in Algerian goats' milk. **African Journal of Biotechnology**, v. 6, n.15, p. 1854-1861, 2007.

CHOI, J.; SABIKHI, L.; HASSAN, A.; ANAND, S. Bioactive peptides in dairy products. **International Journal of Dairy Technology**, v. 65, n. 1, p. 1-12, 2012.

COLLOMB, M.; SCHMID, A.; SIEBER, R.; WECHSLER, D.; RYHÄNEN, E. L. Conjugated linoleic acids in milk fat: Variation and physiological effects. **International Dairy Journal**, v. 16, n. 11, p. 1347-1361, 2006.

CORRÊA, G. F.; ROHENKOHL, J. E.; OSÓRIO, M. T. M. Agronegócio de Leite de Ovinos. In: SELAIVE-VILLARROEL, A. B.; OSÓRIO, J. C. S. (Org.). **Produção de ovinos no Brasil**. 1 ed. São Paulo: Roca, 2014. p. 589-599.a

CORRÊA, G. F.; ROHENKOHL, J. E.; OSÓRIO, M. T. M. Produção e Qualidade do Leite Ovino. In: SELAIVE-VILLARROEL, A. B.; OSÓRIO, J. C. S. (Org.). **Produção de ovinos no Brasil**. 1 ed. São Paulo: Roca, 2014. p. 485- 499.b

CRUZ, A. G.; ANTUNES, A. E. C.; FARIA, J. A. F.; CHAVES, A. C. S. D.; CARVALHO, L. M. J.; SAAD, S. M. I. Leites Fermentados e Iogurtes Probióticos e Prebióticos. In: SAAD, S.M. I.; CRUZ, A. G.; FARIA, J. A. F.(Ed.). **Probióticos e prebióticos em alimentos: fundamentos e aplicações tecnológicas**. 1 ed. São Paulo: Varela, 2011. p. 270-304.

CRUZ-HERNANDEZ, C.; KRAMER, J. K. G.; KENNELLY, J. J.; GLIMM, D. R.; SORENSEN, B. M.; OKINE, E. K.; GOONEWARDENE, L. A.; WESELAKE, R. J.

Evaluating the conjugated linoleic acid and *trans* 18:1 isomers in milk fat of dairy cows fed increasing amounts of sunflower oil and a constant level of fish oil. **Journal of dairy science**, v. 90, n. 8, p. 3786-3801, 2007.

DAMODARAN, S.; PARKIN, K.; FENNEMA, O. R. **Química de alimentos de Fennema**. 4 ed. Porto Alegre: Artmed, 2010. 900 p.

DA SILVA PEDROSO, C. E.; DE MEDEIROS, R. B.; DA SILVA, M. A.; DA JORNADA, J. B. J.; DE SAIBRO, J. C.; TEIXEIRA, J. R. F. Produção de Ovinos em Gestação e Lactação sob Pastejo em Diferentes Estádios Fenológicos de Azevém Anual1. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 33, n. 5, p. 1345-1350, 2004.

DE CAMPOS, L. Pesquisa científica aspectos benéficos do leite de ovelha e seus derivados. **Casa da Ovelha**, 2011.
http://www.casadaovelha.com.br/files/pesquisa_tecno_cientifica.pdf

DE DEA LINDNER, J. **Traditional and innovative approaches to evaluate microbial contribution in long ripened fermented foods:** the case of Parmigiano Reggiano cheese. 2008. 128 f. Tese (Ph. D. in Food Science and Technology) – Università degli Studi di Parma, 2008.

DE DEA LINDNER, J.; PENNA, A. L. B.; DEMIATE, I. M.; YAMAGUSHI, C. T.; PRADO, M. R. M.; PARADA, J. L. Fermented Foods and Human Health Benefits of Fermented Functional Foods. In: SOCCOL, C. R.; PANDEY, A.; LARROCHE, C. (Ed.). **Fermentation Processes Engineering in the Food Industry**. 1 ed. Bosa Roca, 2013. p. 263-297.

DEGUIRE, J. R.; MAKAREM, N.; VANSTONE, C. A.; MORIN, S.; DUQUE, G.; WEILER, H. A. Conjugated linoleic acid is related to bone mineral density but does not affect

parathyroid hormone in men. **Nutrition Research**, n. 32, p. 911-920, 2012.

DE HOLANDA, M. A. C.; DE HOLANDA, M. C. R.; MENDONÇA JR, A. Suplementação dietética de lipídios na concentração de ácido linoléico conjugado na gordura do leite. **Acta Veterinaria Brasilica**, v. 5, p. 221-229, 2012.

DELMONTE, P.; KIA, A. R. F.; KRAMER, J. K.; MOSSOBA, M. M.; SIDISKY, L.; RADER, J. I. Separation characteristics of fatty acid methyl esters 36 using SLB-IL111, a new ionic liquid coated capillary gas chromatographic 37 column. **Journal of Chromatography A**, v. 1218, n. 3, p. 545-554, 2011.

DE OLIVEIRA, M. N.; SIVIERI, K.; ALEGRO, J. H. A.; SAAD, S. M. I. Aspectos tecnológicos de alimentos funcionais contendo probióticos. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 38, n.1, 2002.

DE RENOBLES, M.; AMORES, G.; ARRANZ, J.; VIRTO, M.; BARRÓN, L. J. R.; BUSTAMANTE, M. A.;MANDALUNIZ, N. Part-time grazing improves sheep milk production and its nutritional characteristics. **Food Chemistry**, v. 130, n. 1, p. 90-96, 2012.

DIBBERN, L. C. F. D. A.; FERNANDES, S.; LEAL, N. S.; ZAMBRANO, F.; DO CARMO SERAPHIM, L.; LUCAS, S. Aceitabilidade de iogurte de leite de ovelha com adição de alecrim (*Rosmarinus officinalis L.*) **Veterinária e Zootecnia**, v. 20, n. 1, p. 131-139, 2013.

DOS REIS, D. L.; COUTO, E. P.; RIBEIRO, J. L.; NERO, L. A.; DE AGUIAR FERREIRA, M. Qualidade e segurança microbiológica de derivados lácteos fermentados de origem bovina produzidos no Distrito Federal, Brasil. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 35, n. 6, p. 3161-3172, 2014.

EFSA Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies (NDA); Scientific Opinion on the substantiation of health claims related to conjugated linoleic acid (CLA) isomers and contribution to the maintenance or achievement of a normal body

weight (ID 686, 726, 1516, 1518, 2892, 3165), increase in lean body mass (ID 498, 731), increase in insulin sensitivity (ID 1517), protection of DNA, proteins and lipids from oxidative damage (ID 564, 1937), and contribution to immune defences by stimulation of production of protective antibodies in response to vaccination (ID 687, 1519) pursuant to Article 13(1) of Regulation (EC) No 1924/2006. **EFSA Journal**, n. 8, p. 26, 2010.

FAO/WHO. Guidelines for the evaluation of probiotics in food: report of a Joint FAO/WHO Working Group on Drafting Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food, London, Ontario, Canada, April 30 and May 1, 2002.

FERREIRA, C. L. L. F.; MALTA, H. L.; CARELI, R. T.; DIAS, A. S.; GUIMARÃES, A.; JACOB, F.; CUNHA, R. M.; PEREIRA, S.; OLIVEIRA, S. Verificação da qualidade físico-química e microbiológica de alguns iogurtes vendidos na região de Viçosa. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v. 56, n. 321, p.152-158, 2001 *apud* ARAÚJO, T. F.; FERREIRA, É. G.; SOUZA, J. R.; BASTOS, L. R.; FERREIRA, C. L. Desenvolvimento de iogurte tipo Sundae sabor maracujá feito a partir de leite de cabra. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 67, n. 384, p. 48-54, 2012.

FITZPATRICK, K. C. Regulatory issues related to functional foods and natural health products in Canada: possible implications for manufacturers of conjugated linoleic acid. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 79, p. 1217-1220, 2004.

FLORENCE, A. C. R.; BÉAL, C.; SILVA, R. C.; BOGSAN, C. S.; PILLEGGI, A. L. O.; GIOIELLI, L. A.; OLIVEIRA, M. N. Fatty acid profile, *trans*-octadecenoic, α -linolenic and conjugated linoleic acid contents differing in certified organic and conventional probiotic fermented milks. **Food chemistry**, v. 135, n. 4, p. 2207-2214, 2012.

FOLCH, J.; LEES, M.; SLOANE-STANLEY, G. H. A simple method for the isolation and purification of total lipids from

animal tissues. **Journal of Biological Chemistry**, v. 226, n.1, p. 497-509, 1957.

FOLKENBERG, D. M.; DEJMEK, P.; SKRIVER, A.; SKOV GULDAGER, H.; IPSEN, R. Sensory and rheological screening of exopolysaccharide producing strains of bacterial yoghurt cultures. **International Dairy Journal**, v. 16, n. 2, p. 111-118, 2006.

FURTADO, M. F. **Queijos duros**. São Paulo: Setembro Editora, 2011. 212 p.

GAMA, M. A. S.; RAPOSO, N. R. B.; MURY, F. B.; LOPES, F. C. F.; DIAS-NETO, E.; TALIB, L. L.; GATTAZ, W. F. Conjugated linoleic acid-enriched butter improved memory and up-regulated phospholipase A2 encoding-genes in rat brain tissue. **Journal of Neural Transmission**, p. 1-10, 2015.

GAJO, A. A.; ABREU, L. R.; CARVALHO, M. S.; PAIXÃO, M. G.; PINTO, S. M.; DAVID, F. M. Estudo sensorial de queijo similar ao minas padrão com leite de ovelha utilizando agente coagulante e coalho. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 67, n. 384, p. 61-65, 2012.

GASPAR, P.; CARVALHO, A. L.; VINGA, S.; SANTOS, H.; NEVES, A. R. From physiology to systems metabolic engineering for the production of biochemicals by lactic acid bacteria. **Biotechnology Advances**, v. 31, n. 6, p. 764-788, 2013.

GATTI, M.; DE DEA LINDNER, J.; GARDINI, F.; MUCCHETTI, G.; BEVACQUA, D.; FORNASARI, M. E.; NEVIANI, E. A model to assess lactic acid bacteria aminopeptidase activities in Parmigiano Reggiano cheese during ripening. **Journal of dairy science**, v. 91, n. 11, p. 4129-4137, 2008.

GAULLIER, J. M.; HALSE, J.; HØYE, K.; KRISTIANSEN, K.; FAGERTUN, H.; VIK, H.; GUDMUNDSEN, O. Conjugated linoleic acid supplementation for 1 y reduces body fat mass in healthy overweight humans. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 79, p. 1118-1125, 2004.

GAULLIER, J. M.; HALSE, J.; HØIVIK H., O.; HØYE, K.; SYVERTSEN, C.; NURMINIEMI, M.; HASSFELD, C.; EINERHAND, A.; O'SHEA, M.; GUDMUNDSEN, O. Six months supplementation with conjugated linoleic acid induces regional-specific fat mass decreases in overweight and obese. **British Journal of Nutrition**, v.97, p. 550-560, 2006.

GHOLAMI, Z.; KHOSRAVI-DARANI, K. An Overview of Conjugated Linoleic Acid: Microbial Production and Application. **Mini-Reviews in Medicinal Chemistry**, v. 14, p. 734-746, 2014.

GIRAFFA, G. Selection and design of lactic acid bacteria probiotic cultures. **Engineering in Life Sciences**, v. 12, n. 4, p. 391-398, 2012.

GOLAY, P. A.; DIONISI, F.; HUG, B.; GIUFFRIDA, F.; DESTAILLATS, F. Direct quantification of fatty acids in dairy powders with special emphasis on *trans* fatty acid content. **Food Chemistry**, v. 101, n. 3, p. 1115-1120, 2007.

GÓMEZ-AYALA, A. E. Ácido linoléico conjugado, um nuevo ingrediente funcional. **Offarm Farmacia y Sociedad**, v. 28, p. 44-49, 2009.

GORISSEN, L.; WECKX, S.; VLAEMINCK, B.; RAES, K.; DE VUYST, L.; DE SMET, S.; LEROY, F. Linoleate isomerase activity occurs in lactic acid bacteria strains and is affected by pH and temperature. **Journal of applied microbiology**, v. 111, n. 3, p. 593-606, 2011.

GORISSEN, L.; RAES, K.; DE SMET, S.; DE VUYST, L.; LEROY, F. Microbial production of conjugated linoleic and linolenic acids in fermented foods: Technological bottlenecks. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 114, n. 4, p. 486-491, 2012.

GORISSEN, L.; LEROY, F.; DE VUYST, L.; DE SMET, S.; RAES, K. Bacterial production of conjugated linoleic and linolenic acid in foods: a technological challenge. **Critical**

Reviews in Food Science and Nutrition, v. 55, p. 1561-1574, 2015.

GOUVÊA, M.M; FRANCO, C.F.J.; MARQUES, F.F.C.; PEREIRA NETTO, A.D. Ácidos Linoleicos Conjugados (ALC)- Os Benefícios que Exercem sobre a Saúde Humana e as Principais metodologias Analíticas Aplicadas para a sua Determinação em Leites. **Revista Virtual de Química**, v. 4, n. 6, p. 653-669, 2012.

GUSSO, A.P.; MATTANNA, P.; DE PELLEGRINI, L. G.; CASSANEGO, D. B.; RICHARDS, N. S. P. S.; RIBEIRO, A. S. Comparação de Diferentes Métodos Analíticos para Quantificação de Lipídios em Creme de Ricota. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 67, n. 389, p. 51-55, 2012.

HAENLEIN, G. F. W. Past, present, and future perspectives of small ruminant dairy research. **Journal of Dairy Science**, v. 84, n. 9, p. 2097-2115, 2001.

HARA, A.; RADIN, N. S. Lipid extraction of tissues with a low-toxicity solvent. **Analytical Biochemistry**, v.90, p. 420-426, 1978

HERBEL, B. K.; MCGUIRE, M. K.; MCGUIRE, M. A.; SHULTZ, T. D. Safflower oil consumption does not increase plasma conjugated linoleic acid concentrations in humans. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 67, p. 332-337, 1998.

HERNANDEZ-MENDOZA, A.; LOPEZ-HERNANDEZ, A.; HILL, C. G.; GARCIA, H. S. Bioconversion of linoleic acid to conjugated linoleic acid by *Lactobacillus reuteri* under different growth conditions. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 84, n. 2, p. 180-185, 2009.

HOSSAIN, N. **Development of improved quality Yogurt in terms of texture, flavor, food value and low cost**. 2015. 127 f. M.S dissertation (Master of Science in Biotechnology) -

Department of mathematics and natural sciences, BRAC University, Bangladesh. 2015.

ISO 5508:1990. **Animal and vegetable fats and oils**: Analysis by gas chromatography of methyl esters of fatty acids. Geneva, Switzerland: International Organization for Standardization, 2 ed. , 7 p., 1990.

IP, C.; CHIN, S. F.; SCIMECA, J. A.; PARIZA, M. W. Mammary cancer prevention by conjugated dienoic derivative of linoleic acid. **Cancer Research**, v. 51, p. 6118-6124, 1991.

IP, C.; SINGH, M.; THOMPSON, H. J.; SCIMECA, J. A. Conjugated linoleic acid suppresses mammary carcinogenesis and proliferative activity of the mammary gland in the rat. **Cancer Research**, v. 54, p. 1212-1215, 1994.

IP, M. M.; MASSO-WELCH, P. A.; SHOEMAKER, S. F.; SHEA-EATON, W. K.; IP, C. Conjugated linoleic acid inhibits proliferation and induces apoptosis of normal rat mammary cells in primary culture. **Experimental Cell Research**, v. 250, p. 22-34, 1999.

IYER, R.; TOMAR, S. K.; UMA MAHESWARI, T.; SINGH, R. *Streptococcus termophilus* strains: Multifunctional lactic acid bacteria. **International Dairy Journal**, v. 20, n. 3, p. 133-141, 2010.

JANDAL, J. M. Comparative aspects of goat and sheep milk. **Small Ruminant Research**, v. 22, n. 2, p. 177-185, 1996.

JAY, J. M. **Microbiologia de Alimentos**. 6 ed. Porto Algre: Artmed, 2005. 711 p.

JENKINS, T. C.; WALLACE, R. J.; MOATE, P. J.; MOSLEY, E. E. Board-invited review: Recent advances in biohydrogenation of unsaturated fatty acids within the rumen microbial ecosystem. **Journal of Animal Science**, v. 86, p. 397-412, 2008.

JENKINS, J. K.; COURTNEY, P. D. *Lactobacillus* growth and membrane composition in the presence of linoleic or conjugated

linoleic acid. **Canadian journal of microbiology**, v. 49, n. 1, p. 51-57, 2003.

JERONYMO-CENEVIVA, A. B. O. **Avaliação do potencial probiótico de bactérias ácido lácticas produtoras de substância antimicrobiana isoladas de mussarela de búfala**. 2013. 108 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto. 2013.

JIANG, J.; BJÖRCK, L.; FONDEN, R. Production of conjugated linoleic acid by dairy starter cultures. **Journal of Applied Microbiology**, v. 85, p. 95-102, 1998.

KANEKANIAN, A. The Health Benefits of Bioactive Compounds from Milk and Dairy Products. In: _____. (Ed.). **Milk and Dairy Products as Functional Foods**. UK: Wiley & Sons, Ltd: Chichester, 2014. p. 1 -22.

KATSIARI, M. C.; VOUTSINAS, L. P.; KONDYLI, E. Manufacture of yoghurt from stored frozen sheep's milk. **Food chemistry**, v. 77, n. 4, p. 413-420, 2002.

KEPLER, C. R.; HIRONS, K. P.; MCNEILL, J. J.; TOVE, S. B. Intermediates and products of the biohydrogenation of linoleic acid by *Butyrivibrio fibrisolvens*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 241, n. 6, p. 1350-1354, 1966.

KHAN, Z. I.; ASHRAF, M.; HUSSAIN, A.; MCDOWELL, L. R.; ASHRAF, M. Y. Concentrations of minerals in milk of sheep and goats grazing similar pastures in a semiarid region of Pakistan. **Small Ruminant Research**, v.65, n.3, p. 274-278, 2006.

KHANAL, R. C.; DHIMAN, T. R. Biosynthesis of conjugated linoleic acid (CLA): A review. **Pakistan Journal of Nutrition**, v. 3, p. 72-81, 2004.

KHOSRAVI, A.; SAFARI, M.; KHODAIYAN, F.; GHARIBZAHEDI, S. M. T. Bioconversion enhancement of conjugated linoleic acid by *Lactobacillus plantarum* using the

culture media manipulation and numerical optimization. **Journal of Food Science and Technology**, v.52, p. 5781-5789, 2015.

KHOSRAVI-DARANI, K.; REIHANI, F. S.; FEILI, R.
Bioproduction of Conjugated Linoleic Acid in Yogurt by Probiotic Bacteria. **International Journal of Biotechnology for Wellness Industries**, v. 3, p. 62-68, 2014.

KIM, Y. J.; LIU, R. H. Increase of conjugated linoleic acid content in milk by fermentation with lactic acid bacteria. **Journal of Food Science**, v. 67, n. 5, p. 1731-1737, 2002.

KIM, Y. S.; YOUNG, M. R.; BOBE, G.; COLBURN, N. H.; MILNER, J. A. Bioactive food components, inflammatory targets, and cancer prevention. **Cancer Prevention Research**, v.2, n.3, p. 200-208, 2009.

KISHINO, S.; OGAWA, J.; OMURA, Y.; MATSUMURA, K.; SHIMIZU, S. Conjugated linoleic acid production from linoleic acid by lactic acid bacteria. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 79, n. 2, p. 159-163, 2002.

KRAMER, J. K.G.; FELLNER, V.; DUGAN, M. E. R.; SAUER, F. D.; MOSSOBA, M. M.; YURAWECZ, M. P. Evaluating acid and base catalysts in the methylation of milk and rumen fatty acids with special emphasis on conjugated dienes and total *trans* fatty acids. **Lipids**, v. 32, n. 11, p. 1219-1228, 1997.

LASO, N.; BRUGUÉ, E.; VIDAL, J.; ROS, E.; ARNAIZ, J. A.; CARNÉ, X.; VIDAL S.; MAS S.; DEULOFEU R.; LAFUENTE A. Effects of milk supplementation with conjugated linoleic acid (isomers *cis*-9, *trans*-11 and *trans*-10, *cis*-12) on body composition and metabolic syndrome. **British Journal of Nutrition**, v. 98, p. 860–867, 2007.

LIN, T. Y. Conjugated linoleic acid concentration as affected by lactic cultures and additives. **Food chemistry**, v. 69, n. 1, p. 27-31, 2000.

LIN, T.Y.; LIN, C.W.; LEE, C.H. Conjugated linoleic acid concentration as affected by lactic cultures and added linoleic acid. **Food chemistry**, v. 67, p. 1-5, 1999.

LIU, E.; ZHENG, H.;HAO, P.;KONNO,T.; YU, Y.; KUME, H.; ODA, M.; JI, Z.A model of proteolysis and amino acid biosynthesis for *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* in whey. **Current Microbiology**, v. 65, n. 6, p. 742-751, 2012.

LUCATTO, J. N.; DE MENDONÇA, S. N. T. G.; DRUNKLER, D. A. Ácido linoléico conjugado: estrutura química, efeitos sobre a saúde humana e análise em lácteos. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v.69, p. 199-211, 2014.

MACEDO, G. A.; MACEDO, J. A. Peptídeos Bioativos e bactérias Probióticas. In: SAAD, S.M. I.; CRUZ, A. G.; FARIA, J. A. F. (Ed.). **Probióticos e prebióticos em alimentos: fundamentos e aplicações tecnológicas**. 1 ed. São Paulo: Varela, 2011. p. 85-104.

MACOUZET, M.; LEE, B. H.; ROBERT, N. Production of conjugated linoleic acid by probiotic *Lactobacillus acidophilus* La-5. **Journal of applied microbiology**, v. 106, n. 6, p. 1886-1891, 2009.

MALINSKA, H.; HÜTTL, M.; OLIYARNYK, O.; BRATOVA, M.; KAZDOVA, L. Conjugated linoleic acid reduces visceral and ectopic lipid accumulation and insulin resistance in chronic severe hypertriglyceridemia. **Nutrition**, v. 31, p.1045-1051, 2015.

MAYER, H. K.; FIECHTER, G. Physical and chemical characteristics of sheep and goat milk in Austria. **International Dairy Journal**. v. 24, n. 2, p. 57-63, 2012.

MEHTA, B.; KAMAL-ELDIN, A.; IWANSKIR, Z. **Fermentation: Effects on Food Properties: Chemical & Functional Properties of Food Components**. 1 ed. United States of America: CRC Press, 2012. 399 p.

MENESES, M. A., DA SILVA, F. F., SILVA, R. R., SCHIO, A. R., DA SILVA, G. M., RODRIGUES, E. S. O.; PORTO JR, A. F.; DE SOUZA, D. D.; PONDE, W. P. S. T. S.; DE OLIVEIRA, J. S. O.; PIMENTEL, L. R. Composição em ácidos graxos do leite de vacas alimentadas com glicerina de baixa pureza. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 36, n. 2, p. 971-984, 2015.

MOTTA, V. T. **Bioquímica clínica para laboratório**: princípios e interpretações. 4 ed. Porto Alegre: Editora Médica Missau, 2003.

MUCCHETTI, G.; NEVIANI, E. **Microbiologia e Tecnologia Lattiero-Casearia**. Milano: Tecniche Nuove, 2006.

MRVCIC, J.; STANZER, D.; ŠOLIĆ, E.; STEHLIK-TOMAS, V. Interaction of lactic acid bacteria with metal ions: opportunities for improving food safety and quality. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 28, n. 9, p. 2771-2782, 2012

NAIDU, A. S.; BIDLACK, W. R.; CLEMENS, R. A. Probiotic spectra of lactic acid bacteria. **Food Science and Nutrition**, v. 38, n. 3, p. 13-126, 1999.

NUDDA, A.; BATTACONE, G.; BOA VENTURA NETO, O.; CANNAS, A.; FRANCESCONI, A. H. D.; ATZORI, A. S.; PULINA, G. Feeding strategies to design the fatty acid profile of sheep milk and cheese. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 43, n. 8, p. 445-456, 2014.

OCHOA, J. J.; FARQUHARSON, A. J.; GRANT, I.; MOFFAT, L. E.; HEYS, S. D.; WAHLE, W. J. Conjugated linoleic acids (CLAs) decrease prostate cancer cell proliferation: different molecular mechanisms for *cis*-9, *trans*-11 and *cis*-10, *trans*-12 isomers. **Carcinogenesis**, v. 25, p. 1185-1191, 2004.

OLIVEIRA, M. N. **Tecnologia de produtos lácteos funcionais**. 1. ed. São Paulo: Atheneu, 2009. v. 1. 384 p.

OLIVEIRA, M. N.; DAMIN, M. R. Efeito do teor de sólidos e da concentração de sacarose na acidificação, firmeza e viabilidade

de bactérias do iogurte e probióticas em leite fermentado. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 23, n. 1, p. 172-176, 2003.

OSMAN, K. M.; ZOLNIKOV, T. R.; SAMIR, A.; ORABI, A. Prevalence, pathogenic capability, virulence genes, biofilm formation, and antibiotic resistance of *Listeria* in goat and sheep milk confirms need of hygienic milking conditions. **Pathogens and global health**, v. 108, n. 1, p. 21-29, 2014.

PANDIT, A.; ANAND, S.; KALSCHEUR, K.; HASSAN, A. Production of conjugated linoleic acid by lactic acid bacteria in milk without any additional substrate. **International Journal of Dairy Technology**, v. 65, n. 4, p. 603-608, 2012.

PARIZA, M. W.; PARK, Y.; COOK, M. E. The biologically active isomers of conjugated linoleic acid. **Progress in Lipid Research**, v. 40, p. 283-298, 2001.

PARK, Y.; MCGUIRE, M. K.; BEHR, R.; MCGUIRE, M. A.; EVANS, M. A.; SHULTZ, T. D. High-fat dairy product consumption increases $\Delta^9c'11t-18:2$ (rumenic acid) and total lipid concentrations of human milk. **Lipids**, v. 34, p. 543-549, 1999.

PARK, Y. W.; JUÁREZ, M.; RAMOS, M.; HAENLEING.F.W. Physico-chemical characteristics of goat and sheep milk. **Small Ruminant Research**, v. 68, n. 1, p. 88-113, 2007 *apud* SILANIKOVE, N.; LEITNER, G.; MERIN, U.; PROSSER, C. G. Recent advances in exploiting goat's milk: quality, safety and production aspects. **Small Ruminant Research**, v. 89, n. 2, p. 110-124, 2010.

PARK, Y. W.; JUÁREZ, M.; RAMOS, M.; HAENLEING.F.W. Physico-chemical characteristics of goat and sheep milk. **Small Ruminant Research**, v. 68, n. 1, p. 88-113, 2007.

PARODI, P.W., Conjugated linoleic acid in food. In: SÉBÉDIO, J. L., CHRISTIE, W.W., ADLOF, R. (Eds.), *Advances in Conjugated Linoleic Acid Research*, Champaign: AOCS Press, 2003. p. 101-122, v. 2. *apud* NUNES, J. C.; TORRES, A. G. Fatty acid and CLA composition of Brazilian dairy products, and

contribution to daily intake of CLA. **Journal of food composition and analysis**, v. 23, n. 8, p. 782-789, 2010.

PARODI, P. W. Conjugated linoleic acid and other anticarcinogenic agents of bovine milk fat. **Journal of Dairy Science**, v. 82, p. 1339-1349, 1999.

PELLEGRINI, L. G. **Caracterização do leite ovino em função do período de lactação**. 2012. 60 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Centro de Ciências Rurais, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria. 2012.

PESCUMA, M.; HÉBERT, E. M.; MOZZI, F.; FONT DE VALDEZ, G. Whey fermentation by thermophilic lactic acid bacteria: Evolution of carbohydrates and protein content. **Food Microbiology**, v. 25, n. 3, p. 442-451, 2008.

PINHO, D. M. M.; SUAREZ, P. A. Z. A Hidrogenação de Óleos e Gorduras e suas Aplicações Industriais. **Revista Virtual de Química**, v. 5, p. 47-62, 2013.

PORTO, B. L. S. **Métodos rápidos para análise de ácidos graxos em alimentos e seleção de biomarcadores para aterosclerose**. 2015. 105 f. Tese (Doutorado em Química) - Instituto de Ciências Exatas, Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora. 2015.

PRANDINI, A.; SIGOLO, S.; TANSINI, G.; BROGNA, N.; PIVA, G. Different level of conjugated linoleic acid (CLA) in dairy products from Italy. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 20, p. 472-479, 2007.

PRIETO, B.; FRANCO, I.; PRIETO, J. G.; BERNARDO, A.; CARBALLO, J. Proteolytic and lipolytic changes during the ripening of Leo' n raw cow's milk cheese, a Spanish traditional variety. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 37, n. 3, p. 661-671, 2002.

RAMCHANDRAN, L.; SHAH, N. P. Proteolytic profiles and angiotensin-I converting enzyme and α -glucosidase inhibitory

activities of selected lactic acid bacteria. **Journal of Food Science**, v. 73, n. 2, p. 75-81, 2008.

RAYNAL-LJUTOVAC, K.; LAGRIFFOUL, G.; PACCARD, P.; GUILLET, I.; CHILLIARD, Y. Composition of goat and sheep milk products: An update. **Small Ruminant Research**, v. 79, n. 1, p. 57-72, 2008.

REIS, J. A.; PAULA, A. T.; CASAROTTI, S. N.; PENNA, A. L. B. Lactic Acid Bacteria Antimicrobial compounds: characteristics and applications. **Food Engineering Reviews**, v. 4, n. 2, p. 124-140, 2012.

RESEARCH AND MARKETS. 2014. Global Functional Food and Nutraceuticals Market (2014 - 2020) - By Type (Foods, Beverages, Supplements); Benefits (Health and Wellness, Disease Prevention, Fitness, Beauty); Origin & Ingredient. Accessed in July 25 2015.
http://www.researchandmarkets.com/research/33gvv3/global_functional

RISERUS, U.; BERGLUND, L.; VESSBY, B. Conjugated linoleic acid (CLA) reduced abdominal adipose tissue in obese middle-aged men with signs of metabolic syndrome: a randomized controlled trial. **International Journal of Obesity**, v. 25, p. 1129-1135, 2001.

RITZENTHALER, K. L.; MCGUIRE, M. K.; FALEN, R.; SHULTZ, T. D.; DASGUPTA, N.; MCGUIRE, M. A. Estimation of conjugated linoleic acid intake by written dietary assessment methodologies underestimates actual intake evaluated by food duplicate methodology. **Journal of Nutrition**, v. 131, p. 1548-1554, 2001.

RODRIGUES, D. **Otimização de um método analítico para determinação de ácidos graxos em plasma sanguíneo de rato**. 33 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Licenciatura em Química) - Departamento de Química, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Bauru, 2015.

RODRÍGUEZ-ALCALÁ, L. M.; BRAGA, T.; MALCATA, F. X.; GOMES, A.; FONTECHA, J. Quantitative and qualitative determination of CLA produced by *Bifidobacterium* and lactic acid bacteria by combining spectrophotometric and Ag+-HPLC techniques. **Food Chemistry**, v. 125, n. 4, p. 1373-1378, 2011.

SACCARO, D. M. **Efeito da associação de culturas starter e probióticas na acidificação, textura e viabilidade em leite fermentado.** 2008. 119 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) – Programa de Pós Graduação em Tecnologia Bioquímica-Farmacêutica Área de Tecnologia de Alimentos da Universidade de São Paulo – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, São Paulo. 2008.

SALVETTI, E.; TORRIANI, S.; FELIS, G. E. The Genus *Lactobacillus*: A Taxonomic Update. **Probiotics and Antimicrobial Proteins**, v. 4, n. 4, p. 217-226, 2012.

SANTOS, J. A. Iogurte: um bom negócio se feito com profissionalismo. **Indústria de Laticínios**, n. 18, p. 20-27, 1998 *apud* ARAÚJO, T. F.; FERREIRA, É. G.; SOUZA, J. R.; BASTOS, L. R.; FERREIRA, C. L. Desenvolvimento de iogurte tipo Sundae sabor maracujá feito a partir de leite de cabra. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 67, n. 384, p. 48-54, 2012.

SERAPEIMIDOU, A.; ZLATANOS, S.; KRITIKOS, G.; TOURIANIS, A. Change of fatty acid profile, including conjugated linoleic acid (CLA) content, during refrigerated storage of yogurt made of cow and sheep milk. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 31, p. 24-30, 2013.

SERAPEIMIDOU, A.; ZLATANOS, S.; LASKARIDIS, K.; SAGREDOS, A. Chemical characteristics, fatty acid composition and conjugated linoleic acid (CLA) content of traditional Greek yogurts. **Food Chemistry**, v. 134, n. 4, p. 1839-1846, 2012.

SILVA, L. F. **Identificação e caracterização da microbiota láctica isolada de queijo mussarela de búfala.** 2010, 153 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) - Instituto de

Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista “Julio Mesquita Filho”, São José do Rio Preto, 2010.

SKOOG, D. A.; HOLLER, F. J.; NIEMAN, T. A. **Princípios de Análise Instrumental**. 5 ed. Porto Alegre: Bookman, 2006. 839 p.

SMIT, G.; SMIT, B. A.; ENGELS, W. J. M. Flavour formation by lactic acid bacteria and biochemical flavour profiling of cheese products. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 29, n. 3, p. 591-610, 2005.

SMIT, L. A.; KATAN, M. B.; WANDERS, A. J.; BASU, S.; BROUWER, I. A. A high intake of *trans* fatty acids has little effect on markers of inflammation and oxidative stress in humans. **Journal of Nutrition**, v. 141, p. 1673-1678, 2011.

SOUZA, A.D. S.; OSÓRIO, M.; OSÓRIO, J.; OLIVEIRA, N.; VAZ, C.; SOUZA, M.; CORREA, G. Produção, composição química e características físicas do leite de ovinos da raça Corriedale. **Current Agricultural Science and Technology**, v. 11, n. 1, 2012.

STACHOWSKA, E.; SIENNICKA, A.; BAŚKIEWCZ-HAŁASA, M.; BOBER, J.; MACHALINSKI, B.; CHLUBEK, D. Conjugated linoleic acid isomers may diminish human macrophages adhesion to endothelial surface. **International Journal of Food Sciences and Nutrition**, v. 63, p. 30-35, 2012.

SUSKOVIC, J.; KOS, B.; BEGANOVIĆ, J.; LEOŠ PAVUNC, A.; HABJANIČ, K.; MATOŠIĆ, S. Antimicrobial Activity – The Most Important Property of Probiotic and Starter Lactic Acid Bacteria. **Food Technology Biotechnology**, v. 48, n. 3, p. 296-307, 2010.

TERÁN, V.; PIZARRO, P. L.; ZACARÍAS, M. F.; VINDEROLA, G.; MEDINA, R.; VAN NIEUWENHOVE, C. Production of conjugated dienoic and trienoic fatty acids by lactic acid bacteria and *bifidobacteria*. **Journal of Functional Foods**, v. 19, p. 417-425, 2015.

THARMARAJ, N.; SHAH, N. Antimicrobial effects of probiotic bacteria against selected species of yeast and moulds in cheese based dips. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 44, n. 10, p. 1916-1926, 2009.

THUILLIER, P.; PANDE N. T.; GHENA A.; SONG S.; LAWRENCE Y.; SHRIDHAR V.; AKKARI Y.; PEJOVIC T.; OLSON S. Dietary Conjugated Linoleic Acids Arrest Cell Cycle Progression and Prevent Ovarian Cancer Xenografts Growth Suggesting a *Trans*-10 *Cis*-12 Isoform Specific Activity. **Journal of Cancer Therapy**, v. 4, p. 33-42, 2013.

TRIGUEROS, L.; SENDRA, E. Fatty acid and conjugated linoleic acid (CLA) content in fermented milks as assessed by direct methylation. **LWT-Food Science and Technology**, v. 60, n. 1, p. 315-319, 2015.

TSIPLAKOU, E.; MOUNTZOURIS, K. C.; ZERVAS, G. Concentration of conjugated linoleic acid in grazing sheep and goat milk fat. **Livestock Science**, v. 103, n. 1, p. 74-84, 2006.

TVRZICKA, E.; KREMMYDA, L. S.; STANKOVA, B.; ZAK, A. Fatty acids as biocompounds: their role in human metabolism, health and disease—a review. Part 1: classification, dietary sources and biological functions. **Biomedical papers of the Medical Faculty of the University Palacký, Olomouc, Czechoslovakia**, v. 155, p. 117-130, 2011.

VAN NIEUWENHOVE, C. P.; OLISZEWSKI, R.; GONZÁLEZ, S. N.; PEREZ CHAIA, A. B. Conjugated linoleic acid conversion by dairy bacteria cultured in MRS broth and buffalo milk. **Letters in Applied Microbiology**, v. 44, p. 467-474, 2007.

VILJOEN, B. C. The interaction between yeasts and bacteria in dairy environments. **International Journal of Food Microbiology**, v. 69, n. 3, p. 37-44, 2001.

VISENTAINER, J. V. Aspectos analíticos da resposta do detector de ionização em chama para ésteres de ácidos graxos em biodiesel e alimentos. **Química Nova**, v. 35, n. 2, p. 274-279, 2012.

VOUTSINAS, L. P.; KATSIARI, M. C.; PAPPAS, C. P.; MALLATOU, H. Production of yoghurt from sheep's milk which had been concentrated by reverse osmosis and stored frozen. 2. Compositional, microbiological, sensory and physical characteristics of yoghurt. **Food research international**, v. 29, n. 3, p. 411-416, 1996.

WANG, Y.; DELETTRE, J.; GUILLOT, A.; CORRIEU, G.; BÉAL, C. Influence of cooling temperature and duration on cold adaptation of *Lactobacillus acidophilus* RD758. **Cryobiology**, v. 50, n. 3, p. 294-307, 2005.

WANG, Y. W.; JONES, P. J. H. Conjugated linoleic acid and obesity control: efficacy and mechanisms. **International Journal of Obesity**, v. 28, p.941-955, 2004.

WATKINS, B. A.; LI, Y.; SÉBÉDIO, J. L.; CHRISTIE, W. W.; ADLOF, R. CLA in functional food: enrichment of animal products. **Advances in conjugated linoleic acid research**, v. 2, p. 174-188, 2003.

WENDORFF, W. L. Freezing qualities of raw ovine milk for further processing. **Journal of Dairy Science**, v. 84, p. 74-78, 2001.

WHIGHAM, L.D.; WATRAS, A. C.; SCHOELLER, D. A. Efficacy of conjugated linoleic acid for reducing fat mass: a meta-analysis in humans. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 85, p. 1203-1211, 2007.

XU, S; BOYLSTON, T. D.; GLATZ, B. A. Conjugated linoleic acid content and organoleptic attributes of fermented milk products produced with probiotic bacteria. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 53, n. 23, p. 9064-9072, 2005.

XU, S.; BOYLSTON, T. D.; GLATZ, B. A. Effect of lipid source on probiotic bacteria and conjugated linoleic acid formation in milk model systems. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 81, p. 589-595, 2004.

YURAWECZ, M. P., HOOD, J. K., ROACH, J. A., MOSSOBA, M. M., DANIELS, D. H., KU, Y. PARIZA, M. W. CHIN, S. F. Conversion of allylic hydroxyl oleate to conjugated linoleic acid and methoxy oleate by acid-catalyzed methylation procedures. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 71, n.10, p. 1149-1155, 1994.

ZHANG, H.; XIE, L.; ZHANG, W.; ZHOU, W.; SU, J.; LIU, J. The association of biofilm formation with antibiotic resistance in lactic acid bacteria from fermented foods. **Journal of Food Safety**, v. 33, n. 2, p. 114-120, 2013.

ZHENG, Z.; LIAO, P.; LUO, Y.; LI, Z. Effects of fermentation by *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, refrigeration and simulated gastrointestinal digestion on the antigenicity of four milk proteins. **Journal of Food Processing and Preservation**, v. 38, n. 3, p. 1106-111, 2014.

ZYGOYIANNIS, D. Sheep production in the world and in Greece. **Small ruminant research**, v. 62, n. 1, p. 143-147, 2006.

APÊNDICE A – TRABALHO PUBLICADO

Figura 7. Revisão da literatura sobre Biohidrogenação do AL por BAL



Review

Biohydrogenation of Linoleic Acid by Lactic Acid Bacteria for the Production of Functional Cultured Dairy Products: A Review

Gabriela Christina Kuhl and Juliano De Dea Lindner *

Food Science and Technology Department, Federal University of Santa Catarina, Florianópolis 88034-001, Brazil; gabrielac.kuhl@hotmail.com

* Correspondence: juliano.lindner@ufsc.br; Tel.: +55-48-3721-6183; Fax: +55-48-3721-6290

Academic Editor: Felix Barron

Received: 29 September 2015; Accepted: 15 February 2016; Published: 23 February 2016

Abstract: Conjugated linoleic acid (CLA) isomers have attracted significant attention due to their important physiological properties, which have been observed in humans. Many lactic acid bacteria (LAB) demonstrate the ability to produce CLA isomers (C18:2 *cis*-9, *trans*-11 and C18:2 *trans*-10, *cis*-12) from the linoleic acid (LA) present in milk or in synthetic media. CLA isomers can be synthesized *in vitro* by LAB using vegetable oils rich in LA. The aim of this review is to present an update on the studies that have been conducted on the production of CLA isomers from LA mainly by LAB and of the factors that influence this conversion (source and concentration of LA and fermentation conditions). In addition, this review presents the relationship between the consumption of CLA isomers and their health benefits in humans such as anti-atherosclerosis and anti-carcinogenic effects. There is considerable variation between the studies concerning the beneficial effects of CLA in animal models, which have not been reflected in human studies. This can be attributed to the differences in the doses of CLA isomers used and to the different sources of CLA. Furthermore, the regulatory and scientific information classifying the physiological properties of CLA, which serve as support for the claims of its potential as a functional ingredient, are presented. More research is needed to determine whether CLA production by LAB can be enhanced and to determine the optimal requirements for these microbial cultures. Furthermore, safety and efficacy of CLA consumption have to be investigated in the future.

Keywords: functional food; conjugated linoleic acid; biohydrogenation; lactic acid bacteria; dairy products

1. Introduction

The pharmaceutical industry offers a wide range of drugs to cure many illnesses, and the trend is shifting towards the use of some diets or food bioactive compounds that could potentially prevent some chronic diseases, if they are taken together with a healthy lifestyle, as an alternative or complement to medicine.

The consumption of certain fruits, vegetables, herbs and dairy products, especially the fermented ones, has been recommended as part of a healthy diet to provide essential nutrients and ease or cure many chronic diseases [1]. In the 1980s, the term “functional foods” (FOSHU—foods for specified health use) was introduced in Japan to characterize a new understanding of foods that included their medicinal properties as a way to decrease the costs to the states with regard to the population's healthcare. Functional foods are those that, besides contributing to nutrient intake, contain substances